

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE COMPARATIVE DES EFFETS DE L'ACCUMULATION
INTRACELLULAIRE DU CADMIUM CHEZ LES ALGUES *CHLAMYDOMONAS*
REINHARDTII ET *CHLAMYDOMONAS ACIDOPHILA*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

MAHSHID SAMADANI

MARS 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Les expériences acquises lors de la réalisation d'une maîtrise en sciences m'ont apporté des connaissances professionnelles et je voudrais remercier de nombreux compagnons qui m'ont soutenu durant toute la durée de mes études.

Je remercie grandement mon directeur de recherche le Pr David Dewez pour son appui et ses conseils et son enthousiasme pour la réalisation de mon projet de recherche. Une expertise internationale du professeur Dewez sur les sujets de la biologie, biochimie et toxicologie des algues m'a permis de réaliser mes études de maîtrise.

Je remercie aussi le Dr François Perreault pour son enseignement sur les techniques au laboratoire, sans ses conseils et son aide et aussi sans sa présence, le travail aurait été beaucoup plus difficile pour moi.

Je remercie aussi le Pr Philippe Juneau pour l'ouverture de son laboratoire et ses conseils et aussi son équipe chaleureuse.

Je remercie également l'équipe chaleureuse et gentille du laboratoire du professeur Dewez, le Dr Laura Pirastru et Dr Abdallah Oukarroum pour leurs conseils, leurs aides et leurs collaborations.

Je voudrais aussi remercier les professeurs de l'UQAM qui m'ont encadré durant les cours du programme de maîtrise, le Pr Mohamed Sij et le Pr Alexandre Gagnon. Je voudrais dire ici que je remercie aussi tous les professeurs qui m'ont encadré durant mes études universitaires au premier et au deuxième cycle en Iran, spécialement le Dr Hossain Samimi et le Pr Ali Massoumi qui sont malheureusement décédés, mais leurs expériences, leurs compétences et leurs enseignements dans le domaine de la chimie analytique m'ont apporté des connaissances scientifiques.

Je remercie également tous mes collègues de laboratoire, les gens du département de chimie de l'UQAM, merci beaucoup à Mme Sonia Lachance et les gens de la bibliothèque des sciences de l'UQAM.

Finalement, je tiens à remercier mes parents Asghar, Zohreh et ma famille, qui m'ont soutenu durant toutes mes études et je remercie enfin tous mes amis, spécialement Pejman et Fahimeh qui m'ont encouragé jusqu'à la fin de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xvii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I	
LE CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL.....	3
1.1 La contamination des eaux usées par les métaux.....	3
1.2 Le métal étudié.....	4
1.3 Les technologies d'assainissement de l'eau.....	7
1.3.1 L'utilisation des algues dans l'assainissement des eaux usées.....	10
1.3.2 Les systèmes de traitement des eaux usées en utilisant les algues.....	12
1.4 Problématique et objectif de recherche.....	16
1.4.1 Problématique.....	16
1.4.2 Objectif de recherche.....	16
CHAPITRE II	
LA BIOCHIMIE DES ALGUES VERTES.....	18
2.1 La cellule végétale.....	18
2.1.1 L'algue verte comme modèle d'étude.....	18
2.1.2 Les mécanismes des effets toxiques du Cd au niveau cellulaire.....	23
2.1.3 Les indicateurs cellulaires et biochimiques des effets toxiques du Cd.....	25
2.1.4 Les mécanismes de réponse au stress envers le Cd.....	26
2.2 La photosynthèse.....	40
2.2.1 La cellule végétale et la photosynthèse.....	41
2.2.2 Le fonctionnement du photosystème.....	48
2.2.3 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II.....	56
2.2.4 Induction de la fluorescence.....	59

2.2.5 Principe de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne.....	61
CHAPITRE III	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	64
3.1 Le matériel et les équipements analytiques	64
3.1.1 Liste du matériel utilisé	64
3.1.2 Les appareils	65
3.1.3 Les logiciels	65
3.2 Les approches méthodologiques	65
3.2.1 Les cultures d'algues	65
3.2.2 Traitement au cadmium	66
3.2.3 La mesure de la densité cellulaire	68
3.2.4 La mesure de l'accumulation intracellulaire en cadmium	69
3.2.5 Les mesures au cytomètre en flux	69
3.2.6 La mesure de la fluorescence chlorophyllienne	71
CHAPITRE IV	
CADMIUM BIOACCUMULATION EFFECT ON CELLULAR PARAMETERS OF <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> AND <i>CHLAMYDOMONAS ACIDOPHILA</i>	74
4.1 Résumé	75
4.2 Abstract.....	76
4.3 Introduction.....	77
4.4 Material and methods	79
4.4.1 Biological material	79
4.4.2 Cadmium treatment	80
4.4.3 Cell density	80
4.4.4 Cd bioaccumulation.....	81
4.4.5 Flow cytometry analysis	81
4.4.6 Chl <i>a</i> fluorescence	82
4.4.7 Data analysis and statistics.....	82
4.5 Results	83
4.5.1 Metal speciation	83
4.5.2 Change of cell density	83
4.5.3 Bioaccumulation of Cd	84

4.5.4 Cellular morphology.....	84
4.5.5 Esterases enzymes activity.....	85
4.5.6 Fluorescence measurements.....	85
4.6 Discussion.....	86
4.6.1 Bioaccumulation effect of Cd on cellular division.....	86
4.6.2 Alteration of cellular characteristics.....	88
4.6.3 Alteration of photosynthetic electron transport.....	90
4.7 Conclusions.....	92
4.8 Acknowledgments.....	92
4.9 References.....	93
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	105
BIBLIOGRAPHIE.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Un système du traitement des eaux usées (d'après Abdel-Raouf, Al-Homaidan, Ibraheem, 2012).....	8
1.2 La précipitation de différents métaux en ajoutant la soude caustique (d'après Fabiani, 1992).....	9
1.3 Représentation schématique de l'utilisation des algues pour le traitement et la production de biocarburant, un système combiné (d'après Sivakumar <i>et al.</i> , 2012).	12
1.4 Culture commerciale de <i>Spirulina</i> cultivée par Cyanotech Corp., Hawaii (A) et de <i>Arthrospira</i> cultivée par Earthrise Farms, Californie (B) (Muñoz et Guieysse, 2006; Richmond, 2004; Spolaore <i>et al.</i> , 2006).	13
1.5 Représentation schématique des photobioréacteurs fermés (<i>tubular</i> , <i>flat plate</i>) pour la culture des algues et leur alimentation par l'air enrichie en CO ₂ . (A) une spirale verticale (B) une colonne tubulaire inclinée et (C) une plaque plane verticale (d'après Tredici, 1999).....	14
1.6 Photobioréacteurs tubulaires représentant des tubes horizontaux (d'après Abdel-Raouf, Al-Homaidan, Ibraheem, 2012).....	15
2.1 Représentation schématique d'une cellule de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , V; vacuole, F; flagella, N; noyau, Nu; nucléoles, S; amidon, P; pyrénioïde, Es; ocelle, C; chloroplaste, St; stroma, T; thylacoïde (d'après Dent, Han et Niyogi, 2001).	19
2.2 Représentation schématique d'une cellule de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> soumise aux différents stress (d'après Mendez-Alvarez, Leisinger et Eggen, 1999).	21
2.3 La morphologie générale de <i>C. acidophila</i> isolée à partir du lac de Katanuma au Japon, CW; paroi cellulaire, V; vacuole, F; flagella, N; noyau NU; nucléoles, S; amidon (d'après Nishikawa et Tominaga, 2001).	22
2.4 Mécanismes de distribution cellulaire des métaux (d'après Clemens, 2001).	27
2.5 La structure chimique de la phytochélatine (d'après Pal et Rai, 2010).	30

2.6 Schéma représentant la phytochélatine (γ -Glu-Cys) ₂ - Gly (d'après Cruz <i>et al.</i> , 2002).....	31
2.7 Interaction des phytochélatines avec les ions de cadmium(d'après Pal et Rai, 2010).....	32
2.8 La voie de la synthèse des phytochélatines. GSH; glutathion, PC; phytochélatine, PC _s ; phytochélatine synthétase (d'après Lagadic <i>et al.</i> , 1998).....	33
2.9 La structure chimique du glutathion (d'après Pal et Rai, 2010).....	34
2.10 La voie de la biosynthèse du glutathion (d'après Stoiber, Shafer et Armstrong, 2010).....	34
2.11 Un modèle représentant la détoxification et le métabolisme des métaux non essentiels, M ⁿ⁺ représente un métal (d'après Howe et Merchant, 1992).....	36
2.12 Mécanismes impliqués dans la chélation de Cd et la séquestration dans la vacuole. MMW; un complexe ayant un poids moléculaire moyen et isolé des cellules de <i>R. serpentina</i> (Figure modifiée de Tomsett et Thurman, 1988).....	38
2.13 La micrographie électronique d'un chloroplaste par Staehelin, A. L. avec l'aimable permission de Andrew L. Staehelin et Richard Hallick. (http://www.blc.arizona.edu/courses/181gh/rick/photosynthesis/chloroplasts.htm).....	42
2.14 Les réactions lumineuses et biochimiques de la photosynthèse (d'après Malkin et Niyogi, 2000).....	43
2.15 La structure moléculaire de la chlorophylle <i>a</i> (d'après Whitmarsh et Govindjee, 1999).....	44
2.16 Les spectres d'absorption des molécules de la chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> et de la bactériochlorophylle <i>a</i> (d'après Malkin et Niyogi, 2000).....	45
2.17 Les niveaux d'énergie dans la molécule de chlorophylle (d'après Malkin et Niyogi, 2000).....	46
2.18 Schéma de l'organisation des pigments participant au transfert d'énergie dans le PSII (d'après Jupin et Lamant, 1999).....	47
2.19 Fonctionnement d'une unité photosynthétique (d'après Brack et Mathis, 2000).....	47
2.20 Disposition schématique des complexes protéiques et les cofacteurs impliqués dans le transport d'électrons et le transport de protons au cours de la photosynthèse dans les plantes supérieures. LHCI et LHCII, Complexe collecteur de lumière (<i>Light Harvesting Complexes</i>) du PSI et du PSII; Q _A et Q _B , Quinone A et B, accepteur primaire et secondaire d'électron du PSII; Pheo, Phéophytine; PQ, PQH ₂ , Plastoquinone à l'état oxydé et réduit; PC, Plastocyanine; F _d , Ferrédoxine; FNR, Ferrédoxine NADP-réductase; l'ATP	

synthétase avec les facteurs de couplage (CF_0 et CF_1). Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 1999).....	48
2.21 Modèle structurel des composés du centre réactionnel du PSII chez les plantes supérieures et les algues. D1 et D2, protéines dominantes du PSII; CP43 et CP47, protéines de l'antenne interne; cyt <i>b559</i> , cytochrome <i>b559</i> ; Q_A , quinone <i>a</i> ; Q_B , quinone <i>b</i> ; Mn_4O_xCa , tétramère (<i>cluster</i>) de manganèse d'oxygène de calcium où $x \geq 4$, impliqué dans l'extraction des électrons de l'eau; P680, la paire spéciale de chlorophylles (P_{D1} et P_{D2}) du PSII; Chl $_{D1}$, le donneur primaire d'électron; Pheo $_{D1}$, la phéophytine sur D1 qui est l'accepteur primaire d'électron; Y $_Z$ (sur D1) et Y $_D$ (sur D2) sont les résidus tyrosine redox active; PQ, Plastoquinone mobile dans la membrane; LHC-II, Complexe collecteur de lumière du PSII; PsbO (33 kDa), PsbQ (16 kDa) et PsbP (23 kDa) sont des protéines extrinsèques qui stabilisent et optimisent le complexe de la photolyse de l'eau et son activité. Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Govindjee <i>et al.</i> , 2010).	50
2.22 Schéma de la formation des états S et la production de protons pendant la photooxydation de l'eau conduisant au dégagement d' O_2 (Buchanan, Gruissem et Jones, 2000).	53
2.23 Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétiques en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. La durée approximative du transfert d'électrons est indiquée pour plusieurs réactions. Mn_4O_xCa , tétramère (<i>cluster</i>) de manganèse d'oxygène et de calcium où $x \geq 4$; Y $_Z$, tyrosine-161 sur la protéine D1; P680, le premier donneur d'électron du PSII; P680*, l'état excité du P680; Pheo, la phéophytine; Q_A , plastoquinone liée; Q_B , plastoquinone liée et non liée au PSII; PQ, le <i>pool</i> de plastoquinones. La boîte centrale (en bleu) représente un complexe de protéines contenant deux molécules cytochromes <i>b₆f</i> et une protéine fer-soufre (FeS) et un cytochrome <i>f</i> (Cyt <i>f</i>); PC, plastocyanine; P700, le centre réactionnel du PSI; P700*, l'état excité de P700; A_0 , une molécule spéciale de chlorophylle <i>a</i> ; A_1 , F_x , F_A/F_B et F_d sont les accepteurs d'électrons du PSI; F_d , férredoxine; FNR, férredoxine NADP-réductase; NADP $^+$, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 1999).	55
2.24 Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (d'après Müller, Li et Niyogi, 2001).	56
2.25 Modèle simple des flux d'énergie dans l'appareil photosynthétique présenté par Strasser et Strasser (1995), basé sur la théorie des flux d'énergie de Strasser (1978, 1981). Les flux d'énergie peuvent être considérés comme un flux absorbé (ABS), un flux d'énergie piégée par le centre réactionnel du PSII (TR), utilisant pour faire la séparation de charge, un flux d'énergie engagé dans le transport d'électrons (ET), un flux d'énergie dissipé sous forme de chaleur ou de fluorescence (DI).	57

2.26 Représentation schématique des principales voies de flux d'énergie liées à la fluorescence chlorophyllienne (Chl <i>a</i>). Comme l'origine de la fluorescence chlorophyllienne vient des systèmes antennaires du PSII, J ^{ABS} est inséré dans la partie concernant le PSII (Stirbet et Govindjee, 2011).....	58
2.27 Les voies de dissipation d'énergie du photosystème II (modèle présenté par Butler, 1978).....	59
2.28 Les antennes collectrices de la lumière avec les centres réactionnels fermés et ouverts. Petites flèches rouges montrent le transfert d'énergie d'excitation à partir d'une molécule de chlorophylle à l'autre; disques verts, Chl <i>a</i> et <i>b</i> ; disques jaunes, les caroténoïdes; disque vert foncé au milieu du panneau (a), centre réactionnel ouvert; disque vert clair au milieu du panneau (b), centre réactionnel fermé. Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Govindjee <i>et al.</i> , 2010).	60
2.29 Courbe d'induction de fluorescence représentant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique; Q _A , accepteur primaire; Q _B , accepteur secondaire; PQH ₂ , Plastoquinone à l'état réduite; P680*, Centre réactionnel du PSII à l'état excité (d'après Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995).	62
3.1 La courbe d'étalon (A) et la courbe de croissance (B) des cultures d'algues <i>C. reinhardtii</i> et <i>C. acidophila</i> dans le milieu HSM et MAM.	66
3.2 Représentation schématique de la cytométrie en flux, FSC, <i>forward scattering detector</i> ; SSC, <i>side scattering detector</i> ; FLD, <i>fluorescence detector</i> (Arsenault, Cvetkovic et Popovic, 1993).	70
4.1 Change in cell density of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> at pH=7, and (C) shows change in cell density of <i>C. acidophila</i> at pH=4. Error bars are the standard deviation of four replicate algal cultures. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).	99
4.2 Intracellular Cd accumulation in <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> at pH=7, and (C) shows intracellular Cd accumulation in <i>C. acidophila</i> at pH=4. Error bars are the standard deviation of four replicate algal cultures. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).	100
4.3 Change in cell size of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH, evaluated by scattered light; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> at pH=7 and (C) shows change in cell size of <i>C. acidophila</i> at pH=4. Error bars are the standard deviation of eight	

measurements. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).....	101
4.4 Change in cell granularity of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH, evaluated by scattered light; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> at pH=7, and (C) shows change in cell granularity of <i>C. acidophila</i> at pH=4. Error bars are the standard deviation of eight measurements. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$)..	102
4.5 Change in esterases enzymes activity of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH, evaluated by Fluorescein fluorescence; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of <i>C. reinhardtii</i> and <i>C. acidophila</i> at pH=7, and (C) shows change in esterases enzymes activity of <i>C. acidophila</i> at pH=4. Error bars are the standard deviation of eight measurements.....	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les sources anthropiques et les quantités de l'émission du cadmium dans l'atmosphère et dans le sol par année (Modifié après Nriagu et Pacyna (1988), conformément à Mhatre et Pankhurst (1997)).	6
1.2 La performance de certaines méthodes de séparation des métaux (d'après Eccles, 1995).	11
3.1 Spéciation de Cd (%) à 25°C dans le milieu HSM et MAM en utilisant le logiciel de calcul de l'équilibre chimique (Visual MINTEQ 2.61).	68
4.1 Cadmium speciation (%) in HSM and MAM culture medium at 25°C using the chemical equilibrium calculation (Visual MINTEQ 2.61).	98
4.2 Photosynthetic-based fluorescence parameters of algal cells exposed 24 h to different concentrations of Cd and pH. Data represent the average of four measurements. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A0	Une molécule spéciale de chlorophylle <i>a</i>
A1	Accepteur d'électrons du PSI
AAS	Spectrométrie d'absorption atomique
ABS/RC	Niveau d'absorption de l'énergie lumineuse (ABS) par centre réactionnel
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
CF ₀ , CF ₁	Facteurs de couplage
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
Chl*	Chlorophylle à l'état excité
¹ Chl*, ³ Chl*	Chlorophylle à l'état singulet et triplet excité
Chl _{D1}	Donneur primaire d'électrons
Cys	Cystéine
Cyt <i>b559</i>	Cytochrome <i>b559</i>
Cyt <i>f</i>	Cytochrome <i>f</i>
DBO	Demande biochimique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène

DEL	Diodes électroluminescentes
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
$F_{20\mu s}$, $F_{300\mu s}$, F_{2ms} , F_{30ms}	Intensité de fluorescence à 20 et 300 μs , 2 et 30 ms
FDA	Diacétate de Fluorescéine
F_d	Ferrédoxine
FI	Induction de la fluorescence chlorophyllienne
FJ, FI	Intensité de fluorescence à la transition J et I
FLD	Détecteur de fluorescence
FNR	Ferrédoxine NADP-réductase
F_o	Fluorescence de base
F_p ou F_M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant
FSC	« <i>Forward scattering detector</i> »
F_v	Fluorescence variable
F_x , FA/FB et F_d	Accepteurs d'électrons du PSI
γ -GCS	γ -glutamylcystéine synthétase
Glu	Glutamine
Gly	Glycine
GR	Glutathion réductase
GSH et GSSG	Glutathion à l'état réduit et oxydé
GS	Glutathion-synthétase
HMW	Complexe de haut poids moléculaire
HSM	« <i>High salt growth medium</i> »
Hsps	Protéines de choc thermique

$h\nu$	Lumière
INPR	Inventaire national des rejets de polluants au Canada
J^{ABC}	Taux d'absorption des photons par les pigments antennaires du PSII
J^{DI}	Flux d'énergie dissipé sous forme de chaleur ou de fluorescence
J^{ET}	Taux du transport d'électrons à partir de la molécule de l'eau à F_d
J^{TR}	Taux de l'énergie piégée par le centre réactionnel du PSII
KDa	Kilodalton
LHCI et LHCII	Complexe collecteur de lumière (<i>Light Harvesting Complexes</i>) du PSI et du PSII
LMW	Complexe de faible poids moléculaire
MAM	« <i>Modified acid medium</i> »
M_0	Vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable
NADP, NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée, sous forme réduite
NPQ ou qN	Quenching non-photochimique
$^1O_2^*$	Oxygène singulet
P700	Centre réactionnel du PSI
P700*	État excité de P700
P680, P680*	Centre réactionnel du PSII à l'état stable et excité
PC	Plastocyanine
PC _s	Phytochélatine synthétase
PEA	« <i>Plant efficiency analyzer fluorimeter</i> »
Pheo	Phéophytine
Pheo _{D1}	Phéophytine sur D1
Pi	Phosphate inorganique

PI	Iodure de propidium
PI _{ABC}	Indice de performance du PSII
PQ, PQH ₂	Plastoquinone à l'état oxydée, réduite (Plastoquinol)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PVC	Polychlorure de vinyle
Q _A	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q _B	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
ϕ_{PO}	Rendement de la réaction photochimique primaire du PSII
RC	Centre réactionnel
SH	Groupe thiol
SHsps	Petites Hsps
SSC	« Side scattering detector »
TEM	Microscopie électronique en transmission
V _J	Fluorescence variable relative à la réduction de Q _A
Y _Z	Résidu tyrosine redox active de la protéine D1

RÉSUMÉ

Le cadmium (Cd) représente un des plus dangereux métaux contaminant l'environnement aquatique via les effluents d'eaux usées. Pour les organismes vivants, ce polluant peut devenir toxique à des concentrations faibles en raison de ses propriétés non essentielles pour les processus physiologiques cellulaires. Pour une application d'assainissement des eaux usées contaminées aux métaux, les effets de la bioaccumulation de Cd ont été comparés entre les algues vertes *C. reinhardtii* et *C. acidophila* dans le but de sélectionner l'espèce la plus résistante au Cd. En considérant le rôle du pH pour la spéciation des métaux dans le milieu et donc leur disponibilité pour les organismes vivants, la bioaccumulation et les fonctions cellulaires et biochimiques ont été analysées et comparées lorsque les algues étaient exposées pendant 72 heures aux différentes concentrations de Cd (50-600 μM) correspondant à 6.173, 12.383, 24.887, 50.212 et 75.954 μM en ion libre de Cd^{2+} à pH=7 et correspondant à 16.572, 50.629, 118.640, 252.940 et 384.870 μM en ion libre de Cd^{2+} à pH=4. L'espèce *C. reinhardtii* a montré une capacité d'accumulation intracellulaire en Cd plus élevée par rapport à *C. acidophila*. La division cellulaire et le transport des électrons photosynthétiques dépendant de l'accumulation intracellulaire en Cd ont montré une réduction lors de l'exposition aux concentrations plus élevées de Cd chez *C. reinhardtii* indiquant la faible tolérance de cette espèce contre les effets toxiques de Cd. Les changements cellulaires plus élevés dans la taille et la granulosité chez *C. reinhardtii* s'expliquent par l'inhibition de la division cellulaire et les dommages cellulaires. Mais l'activité des enzymes estérases reste élevée chez *C. reinhardtii* malgré l'accumulation maximum de Cd à 24h, montrant leur participation à la détoxification du Cd. À faible pH, l'exclusion à la suite de la compétition des ions de H^+ avec les ions de Cd^{2+} pour la liaison à la surface d'algue a empêché l'accumulation intracellulaire en Cd chez *C. acidophila*. Les changements plus élevés dans la granulosité à 48h indiquent probablement l'exclusion. Donc, l'accumulation du Cd en dehors du cytosol entraîne les débris de membrane puis une augmentation significative de la granulosité et la diminution de l'intensité de la fluorescence de Fluorescéine (FDA) à cause de la membrane endommagée. Par conséquent, ces résultats montrent les limitations dans l'utilisation de ces souches d'algues vertes sous deux différents pH, dans une approche d'assainissement des eaux usées.

Mots clés : Cadmium, bioaccumulation, algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas acidophila*, paramètres cellulaires, cytotoxicité.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les humains peuvent être à risque d'exposition aux métaux non essentiels dépendamment de la voie d'exposition et de la dose. Les voies d'exposition les plus courantes sont l'exposition par la chaîne alimentaire et l'eau potable, comme par exemple la consommation des végétaux contaminés en Cd ou des fruits de mer contaminés en Hg (Adriano *et al.*, 2005). Il a été prouvé que le plomb, le cadmium et le mercure peuvent causer de graves dommages aux systèmes nerveux et aux reins (Bernard, 2011). Les sources naturelles et les sources anthropiques sont deux sources fondamentales d'entrée des métaux dans l'environnement (Adriano *et al.*, 2005 ; Gadd, 2009) qui représentent une menace pour la santé des écosystèmes, des micro-organismes et la qualité des eaux douces. Par conséquent, la décontamination des eaux polluées aux métaux est nécessaire pour avoir accès à l'eau potable non contaminée comme étant le plus important besoin humain.

Il existe plusieurs méthodes conventionnelles pour l'élimination des métaux avec des avantages et des désavantages qui sont définis selon leurs efficacités, la nécessité et la quantité des produits chimiques comme des réactifs et aussi l'énergie. Les méthodes biologiques sont intéressantes parce que les microorganismes sont capables d'accumuler les polluants organiques et inorganiques (Eccles, 1999). L'utilisation des algues pour l'assainissement des eaux usées ne conduit pas à la pollution secondaire comme celle qui vient des méthodes conventionnelles pour le traitement des eaux usées ; en fait elles utilisent l'azote et le phosphore inorganiques pour leur croissance (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012). En plus, de nombreuses études ont montré la capacité des algues à éliminer les métaux ainsi que certains composés organiques toxiques (Wang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2011). Par ailleurs, la biomasse produite peut être utilisée pour différentes applications parmi lesquelles la production de biogaz et d'énergie par la digestion de la biomasse (en l'absence d'oxygène) en CH₄ et CO₂ (Muñoz et Guieysse, 2006).

Dans notre travail, pour une application d'assainissement des eaux usées contaminées aux métaux, la capacité d'accumuler le Cd a été comparée entre deux espèces de *Chlamydomonas*, *C. reinhardtii* et *C. acidophila*. Les effets induits par la bioaccumulation de Cd ont été comparées entre ces deux algues vertes dans le but de sélectionner l'espèce la plus appropriée pour accumuler le Cd et la plus résistante aux effets toxiques du Cd. Le pH a été testé comme un facteur influençant la spéciation des métaux en solution, donc la biodisponibilité et les effets toxiques du Cd.

Mon mémoire est organisé en quatre chapitres principaux. Dans le premier chapitre, les contextes environnementaux ont été discutés, comme la qualité de l'eau qui a été détériorée au cours des deux derniers siècles par les métaux; les raisons de la sélection du Cd pour cette étude, la gestion de la pollution environnementale et les technologies d'assainissement de l'eau. La problématique et l'objectif de cette recherche ont aussi été discutés dans ce chapitre. Dans le deuxième chapitre, la biochimie des algues vertes a été discutée telle que la capacité des cellules végétales à répondre à la contamination métallique, les critères de la sélection des algues vertes, spécifiquement les genres de *Chlamydomonas*, les mécanismes des effets toxiques du cadmium au niveau cellulaire, les indicateurs cellulaires et biochimiques de toxicité, les mécanismes de réponse au stress envers le cadmium, la photosynthèse et son importance sur notre planète. Dans le troisième chapitre, les approches méthodologiques ont été présentées concernant la fluorescence chlorophyllienne comme un marqueur de toxicité et la cytométrie en flux comme une méthode rapide de la mesure des fonctions cellulaires et biochimiques. Finalement, les résultats obtenus dans cette étude ont été présentés dans le quatrième chapitre.

CHAPITRE I

LE CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL

1.1 La contamination des eaux usées par les métaux

Plusieurs métaux sont essentiels à la vie biologique pour croître et bien se développer en raison de leur nécessité en petite quantité. Concernant la nutrition des plantes, les métaux tels que Fe, Cu, Zn, Mn, Mo sont considérés comme des métaux essentiels (Adriano *et al.*, 2005). Les métaux lourds représentent un groupe des éléments avec la densité de plus de 5 gr/cm³ et qui causent des effets toxiques chez les microorganismes vivants (Gadd, 2009).

Les sources naturelles comme les minerais, les sols volcaniques, et les sources anthropiques comme les polluants agricoles, la métallurgie, la production d'énergie, l'extraction des minerais, les processus nucléaires, les effluents industriels et les composés organométalliques sont deux sources fondamentales d'entrée des métaux lourds dans l'environnement (Adriano *et al.*, 2005 ; Gadd, 2009). Il existe quelques voies par lesquelles les systèmes des eaux douces peuvent être contaminés telles que le drainage, l'émission directe et la sédimentation. Normalement, la contamination de l'environnement est plus sévère dans les pays développés à cause d'une population plus élevée (Adriano *et al.*, 2005). Par exemple, il a été estimé que les concentrations de Cd dans le cortex rénal et de Pb dans les os concernant la population générale des pays développés étaient plus élevées que les niveaux préindustriels (Bernard, 2011).

La biodisponibilité se définit par le potentiel qu'ont les organismes vivants d'absorber les produits chimiques de l'environnement de sorte qu'ils peuvent être impliqués dans le métabolisme de l'organisme par interaction avec une cible biologique (Adriano *et al.*, 2005). Les espèces cationiques mobiles peuvent être accumulées dans les cellules par

différentes façons telles que la liaison intracellulaire, la précipitation, la transformation et la translocation en des structures spécifiques. Les métaux sont absorbés par les cellules *via* des canaux de façon passive par la perméabilité de la membrane cellulaire et par le transport spécifique consommant l'énergie métabolique. D'autres mécanismes d'accumulation des métaux impliquent les sidérophores ayant une très forte affinité pour l'ion Fe^{3+} et le transport actif des métaux avec les substrats organiques (Gadd, 2009).

Certains processus microbiens sont capables de solubiliser les métaux augmentant leur biodisponibilité et leur potentiel de toxicité, tandis que l'immobilisation des métaux par d'autres processus provoque la réduction de la biodisponibilité des métaux. La mobilisation des métaux peut être effectuée par l'extraction autotrophique et hétérotrophique, la chélation par les métabolites des organismes vivants et les sidérophores, la méthylation entraînant la volatilisation, les réactions redox et la biodégradation des complexes organo-radionucléides. L'immobilisation des métaux est le résultat de sorption avec les peptides capables de lier les métaux, de l'accumulation intracellulaire, de la précipitation organique et inorganique, de l'adsorption et du piégeage par des colloïdes et des particules, de la réduction microbiologique des espèces avec les valences plus élevées (par exemple de Mn(IV) à Mn(II)). Dans le cadre de la remédiation des milieux pollués, la solubilisation est une méthode permettant l'enlèvement des métaux à partir de matrices solides comme les sédiments et les déchets industriels en changeant les métaux en une forme insoluble et chimiquement inerte (Gadd, 2009).

1.2 Le métal étudié

Malgré les effets nocifs connus pour la santé humaine, l'exposition de plus en plus nombreuse aux métaux, spécialement dans les pays les moins développés, continue (Järup, 2003). Les métaux se trouvent dans l'atmosphère, le sol et l'eau et même aux concentrations faibles pouvant causer de graves problèmes à tous les organismes vivants, et leur bioaccumulation dans la chaîne alimentaire peut être dangereuse (Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999).

Le cadmium est un métal non-essentiel que son effet nuisible peut influencer la croissance et le développement des plantes (Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). L'utilisation

principale du cadmium est dans l'industrie métallurgique pour galvaniser l'acier dans le but de le protéger contre la corrosion. L'eau potable peut être contaminée en Cd par les tubes galvanisés, les soudures pour les accords, le chauffe-eau, les refroidisseurs de l'eau et les robinets (World Health Organization, 2011). Les composés du cadmium sont utilisés comme un stabilisant dans les produits en PVC, plusieurs alliages et dans les batteries rechargeables de nickel-cadmium (Järup, 2003). Comme le plomb, le cadmium est l'un des métaux les plus toxiques pour l'organisme humain. Le cadmium est surtout toxique pour les reins et lors de l'exposition chronique au Cd, les reins sont le premier organe montrant les signes de toxicité (Bernard, 2011).

La libération du Cd dans l'environnement vient de la centrale électrique, des systèmes de chauffages, des industries métallurgiques, des incinérateurs de déchets, de la circulation urbaine et des usines de ciment. Le tableau 1.1 montre les sources anthropiques et les quantités d'émission du cadmium dans l'atmosphère et dans le sol par année (Benavides, Gallego et Tomaro, 2005 ; Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). L'émission de cadmium a augmenté de façon spectaculaire au cours du 20^{ème} siècle (Järup, 2003).

Dans cette étude, la bioaccumulation en Cd et les effets sur les fonctions cellulaires et biochimiques ont été analysées chez les algues vertes parce que c'est un métal toxique comme modèle d'étude. Selon Inventaire national des rejets de polluants (INPR) en 2010, 2670 kg de Cd ont été rejetés dans l'eau, dont 45% par les réseaux d'aqueduc et d'égout et 26% par les usines de pâtes à papier et de carton. En 2010, la majorité des rejets de cadmium dans l'eau prévenaient des provinces de l'Ontario, de la Colombie-Britannique et du Québec (INPR). Selon les recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, la concentration maximale acceptable pour le cadmium est de 5 µg/L.

Tableau 1.1 Les sources anthropiques et les quantités de l'émission du cadmium dans l'atmosphère et dans le sol par année (Modifié d'après Nriagu et Pacyna (1988), conformément à Mhatre et Pankhurst (1997).

Émission anthropique de Cd	10 ³ tonnes / année
Atmosphère	
Production d'énergie	0.79
Fusion des métaux et raffinage	5.43
Industrie manufacturière	0.60
Incinération des déchets	0.75
Total	7.57
Sol	
Déchets agricoles	2.20
Exploitation forestière et déchets de bois	1.10
Détritus urbain	4.20
Eaux usées municipales et déchets organiques	0.18
Déchets solides de la fabrication des métaux	0.04
Cendres de charbon	7.20
Engrais et tourbe	0.20
Produits jeté	1.20
Retombées atmosphériques	5.30
Total	21.62
Total global	29.19

1.3 Les technologies d'assainissement de l'eau

La gestion de la pollution environnementale des eaux usées a été un sujet d'actualité, spécialement au cours des deux derniers siècles (Eccles, 1999). La Figure 1.1 montre un système du traitement des eaux usées. L'élimination de la demande biochimique en oxygène (DBO), de N et P, des matières en suspension, des coliformes et des bactéries est l'objectif principal de l'assainissement des eaux usées. La demande biochimique en oxygène (DBO) est la quantité d'oxygène moléculaire que les microorganismes utilisent pour oxyder les matières organiques en CO_2 et en eau. Par conséquent, la DBO va causer une chute de l'oxygène dissous dans le milieu aquatique conduisant un manque de l'oxygène et la mort des poissons. La présence des substances nutritives (l'azote et le phosphore) va causer l'eutrophisation conduisant à l'augmentation indésirable de la croissance des algues (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012).

La première étape du traitement des eaux usées est l'élimination de la majeure partie des matériaux tel que le bois et les grains lourds. En passant, l'effluent dans le réservoir et les matériaux en suspension vont sédimenter. La réduction de la DBO en éliminant les matières organiques constitue le traitement secondaire des eaux usées. Le traitement tertiaire des eaux usées comprend l'élimination des ions métalliques, de l'ammonium, du nitrate et du phosphate et des composés organiques toxiques. La destruction des agents pathogènes va être réalisée par l'étape de la désinfection des eaux usées (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012).



Figure 1.1 Un système du traitement des eaux usées (d'après Abdel-Raouf, Al-Homaidan, Ibraheem, 2012).

La décontamination des eaux polluées par les métaux implique l'élimination des ions métalliques non-essentiels à partir du milieu. Plusieurs métaux est libérée dans l'environnement par les industries de galvanoplastie, l'opération de la finition des métaux, la production des circuits électroniques, l'acier et les processus non ferreux et les industries pharmaceutiques (Eccles, 1999).

Plusieurs méthodes conventionnelles ont démontré l'élimination des métaux à partir de solutions aqueuses telles que l'échange d'ions, l'électrolyse, la précipitation, la filtration et l'évaporation. La précipitation en augmentant le pH de l'effluent (par l'ajout de la chaux) est considérée comme la méthode la plus simple et la moins chère pour éliminer les métaux. La Figure 1.2 montre comment en augmentant le pH de l'effluent liquide, le fer est le premier métal qui est précipité avant d'autres métaux. Cette méthode n'est pas sélective en raison de la production d'une grande quantité de dépôts solides (Fabiani, 1992).

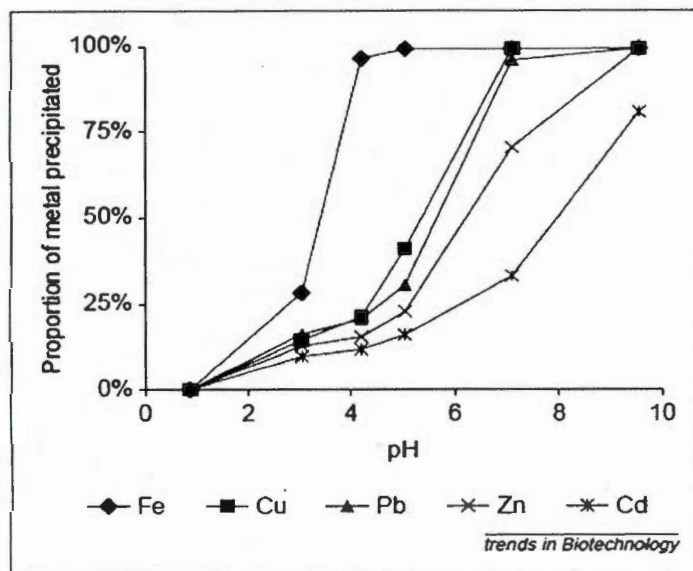


Figure 1.2 La précipitation de différents métaux en ajoutant la soude caustique (d'après Fabiani, 1992).

Dans la méthode de l'échange d'ions, les ions sont échangés entre une solution et un solide qui est normalement une résine. Les résines peuvent se régénérer plusieurs fois et les effluents finaux ont de faibles concentrations en métaux. Dans la méthode d'électrolyse, les métaux sont séparés et aucun réactif n'est nécessaire. D'autres méthodes telles que les processus membranaires, l'osmose et l'osmose inverse, la dialyse ou l'électrodialyse sont aussi utilisées dans des applications très spécialisées. L'efficacité des processus membranaires est limitée par les problèmes de débit et d'instabilité dans les conditions acide et salée. L'adsorption est une méthode relativement simple et les adsorbants industriels tels que le carbone actif, le gel de silice et l'alumine présentent une grande surface pour l'adsorption des impuretés de liquide (Aderhold, Williams et Edyvean, 1996). La performance de certaines méthodes de séparation des métaux a été présentée dans le tableau 1.2 (Eccles, 1995).

En conséquence, les méthodes conventionnelles de séparation des métaux à partir de solutions aqueuses comme la précipitation chimique et l'osmose inverse demandent de grandes quantités de réactifs et d'énergie, ce qui limite l'utilisation pratique de ces méthodes

avec de faibles concentrations en métaux. Les méthodes biologiques sont intéressantes, car les microorganismes sont capables d'accumuler les polluants organiques et inorganiques (Eccles, 1999). La biosorption et la bioaccumulation des métaux par les microorganismes ne sont pas nouveaux et la différence entre les deux a été expliquée par Eccles (1995). La biosorption a été définie comme l'absorption passive et la coordination des ions métalliques par la biomasse microbienne. Tandis que la bioaccumulation a été considérée comme l'absorption des métaux par les cellules vivantes (Eccles, 1995). La biosorption est un exemple spécifique d'adsorption où les espèces chimiques sont liées aux biopolymères (Aderhold, Williams et Edyvean, 1996).

1.3.1 L'utilisation des algues dans l'assainissement des eaux usées

Le rejet des effluents domestiques, industriels et agricoles dans les eaux naturelles est chargé en azote, phosphore inorganique, en métaux et en matières organiques. Cette contamination des eaux usées qui n'est pas traitée complètement par les processus primaires et secondaires va causer des problèmes environnementaux comme l'eutrophisation des cours d'eau. L'utilisation des cultures d'algues pour le traitement des eaux usées est très récente par la production de souches en grande quantité telles que *Chlorella* et *Dunaliella*. L'utilisation des algues pour l'assainissement des eaux usées ne conduit pas à la pollution secondaire ; en fait elles utilisent l'azote et le phosphore inorganique pour leur croissance. En plus, de nombreuses études ont montré la capacité des algues à éliminer les métaux ainsi que certains composés organiques toxiques. Par exemple, la capacité de *C. reinhardtii* a été proposée comme une approche biotechnologique intéressante pour la décontamination des polluants organiques (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012 ; Wang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2011). Par ailleurs, la biomasse produite peut être utilisée pour la production de biogaz et la production d'énergie. L'utilisation de la biomasse obtenue par les traitements des eaux usées industrielles est rarement appropriée pour la production d'aliments ou de produits chimiques comme l'engrais en raison de l'existence des métaux lourds et des contaminants organiques toxiques (Muñoz et Guieysse, 2006). Muñoz et ses collègues (2005) ont utilisé différentes sortes d'algues et de bactéries pour la biodégradation de l'acétonitrile avec une grande efficacité et en produisant du CH₄. Tandis que, dans le traitement utilisant seulement les bactéries, la production de biogaz a été libérée sous forme de CO₂ (Muñoz *et al.*, 2005).

Tableau 1.2 La performance de certaines méthodes de séparation des métaux (d'après Eccles, 1995).

Technologie	Caractéristiques de performance				
	Changement de pH	Sélectivité du métal	Influence des matières en suspension	Tolérance aux molécules organiques	Niveau de travail pour le métal approprié (mg l ⁻¹)
Adsorption (e.g. GAC)	Tolérance limitée	Modérée	Encrassée	Peut être empoisonnée	<10
Électrochimique	Tolérant	Modéré	Peut être machiné pour tolérer	Peut être équipé	>10
Échange d'ion	Tolérance limitée	Résines de chélation peuvent être sélective	Encrassé	Peut être empoisonné	<100
Membrane	Tolérance limitée	Modérée	Encrassée	Intolérant	>10
Précipitation :					
a) Hydroxydes	Tolérant	Non sélectif	Tolérant	Tolérant	>10
b) Sulfures	Tolérance limitée	Sélectivité limitée (dépendance du pH)	Tolérant	Tolérant	>10
Extraction par solvant	Certains systèmes, tolérance en pH	Métal-sélectif (extraction disponible)	Encrassée	Intolérant	>100
GAC : <i>granulated activated carbon</i>					

La Figure 1.3 montre un système combiné utilisant une culture d'algue pour le traitement des eaux usées et la production de biocarburant à partir de la biomasse créée (Sivakumar *et al.*, 2012).

Les métaux sont séquestrés dans les cellules d'algues de manière active (*channel-mediated*) et passive (biosorption) (Das, Vimala et Karthika, 2008 ; Sheng *et al.*, 2004), et ils sont accumulés dans la cellule, à l'intérieur de la vacuole cellulaire, afin de réduire les effets toxiques induits par les ions métalliques libres. Les espèces d'algues sont différentes dans leur capacité à accumuler et à s'adapter aux effets des métaux (Baumann, Morrison et Stengel, 2009 ; Juneau, El Berdey et Popovic, 2002 ; Lavoie *et al.*, 2009 ; Nishikawa, Onodera et Tominaga, 2006 ; Perreault *et al.*, 2010).

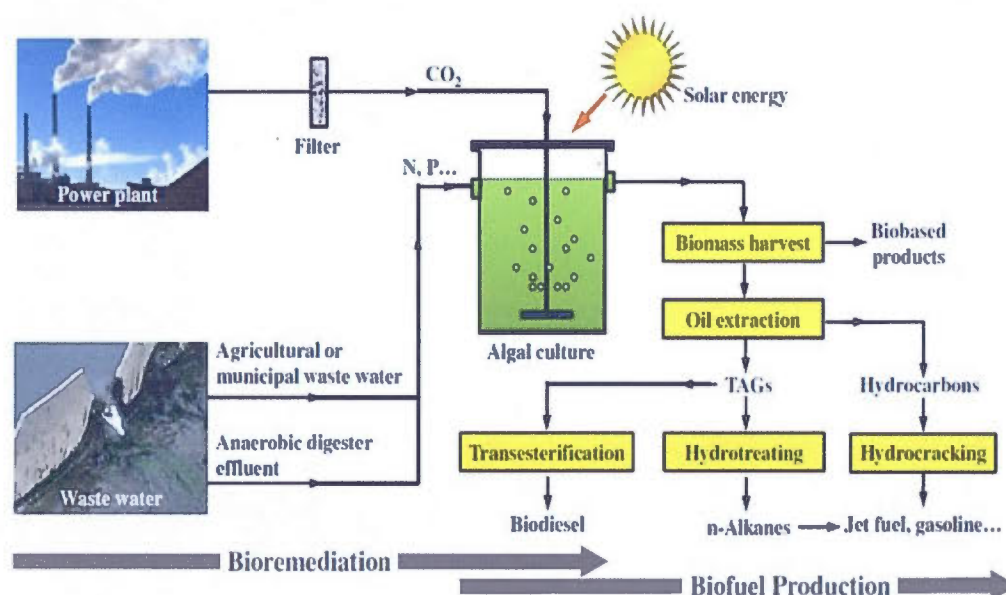


Figure 1.3 Représentation schématique de l'utilisation des algues pour le traitement et la production de biocarburant, un système combiné (d'après Sivakumar *et al.*, 2012).

1.3.2 Les systèmes de traitement des eaux usées en utilisant les algues

Les algues peuvent être utilisées dans le traitement des eaux usées pour l'élimination des coliformes fécaux et des bactéries, la réduction de la demande biochimique ou chimique en oxygène (DBO, DCO), l'élimination de N ou de P, et également pour l'élimination des métaux lourds (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012).

Les critères de base pour planifier les photobioréacteurs pour le traitement des effluents et pour cultiver les algues sont les mêmes. On demande une grande efficacité pour l'utilisation de la lumière, un bon mélange, un faible stress hydrodynamique sur les cellules d'algues photosynthétiques, un faible risque de contamination, un espace minimal nécessaire, une facilité de nettoyage, une consommation d'énergie économique et une facilité à contrôler la température de la culture (Pulz, 2001 ; Ugwu, Aoyagi et Uchiyama, 2008 ; Xu *et al.*, 2009).

Les organismes photosynthétiques peuvent être cultivés dans les réacteurs ouverts ou fermés. Cyanotech Corp à Hawaii et Earthrise Farms en Californie sont deux compagnies qui cultivent les cultures à grande échelle en système ouvert (Figure 1.4 A et B) (Muñoz et Guieysse, 2006 ; Richmond, 2004 ; Spolaore *et al.*, 2006).

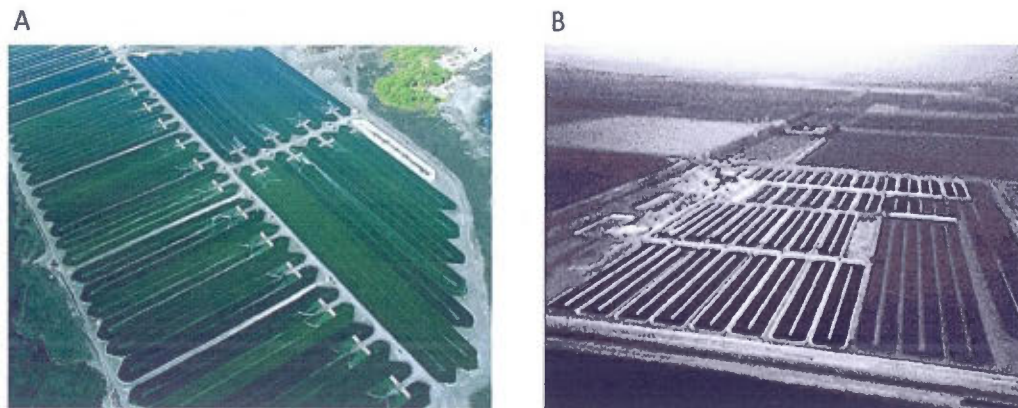


Figure 1.4 Culture commerciale de *Spirulina* cultivée par Cyanotech Corp, Hawaii (A) et de *Arthrospira* cultivée par Earthrise Farms, Californie (B) (Muñoz et Guieysse, 2006 ; Richmond, 2004 ; Spolaore *et al.*, 2006).

La perte de l'eau par évaporation, la contamination, un grand espace nécessaire, le risque de prédation, un faible contrôle sur la volatilisation des polluants et sur les conditions de croissance sont des désavantages concernant les systèmes ouverts par rapport aux photobioréacteurs fermés (Borowitzka, 1999 ; Muñoz et Guieysse, 2006 ; Pulz, 2001). Ces

systèmes commerciaux sont ouverts parce que les systèmes fermés sont plus chers en raison de la nécessité des matériaux transparents tels que le plexiglas, le verre, le PVC et certains d'entre eux sont difficiles à développer à grande échelle. D'un autre côté, l'utilisation de la lumière artificielle entraîne des coûts élevés par rapport aux systèmes ouverts qui utilisent la lumière du soleil (Borowitzka, 1999 ; Muñoz et Guieysse, 2006).

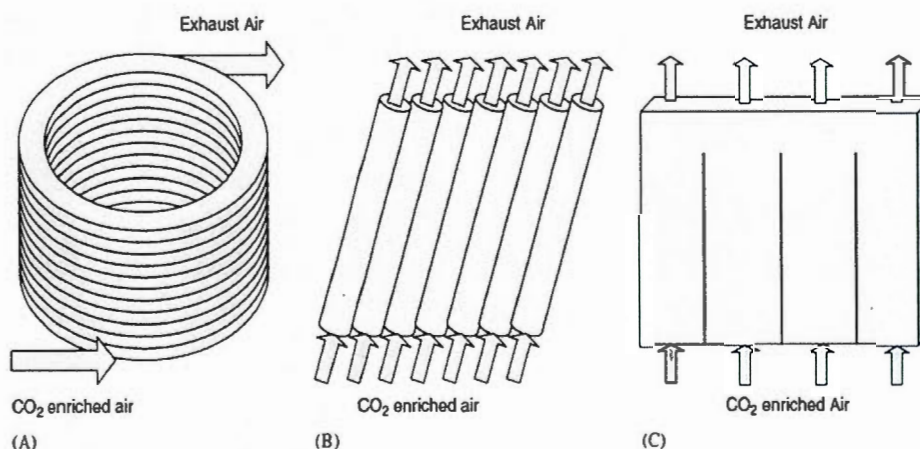


Figure 1.5 Représentation schématique des photobioréacteurs fermés (*tubular*, *flat plate*) pour la culture des algues et leur alimentation par l'air enrichie en CO₂. (A) une spirale verticale (B) une colonne tubulaire inclinée et (C) une plaque plane verticale (d'après Tredici, 1999).

Les photobioréacteurs fermés sont souvent connus comme *tubular* or *flat plate* disposés de manière horizontale, inclinée, verticale ou en spirale (Figure 1.5) (Muñoz et Guieysse, 2006 ; Tredici, 1999). La réduction du trajet de la lumière et l'augmentation de la quantité de la lumière disponible sont deux principaux facteurs permettant de planifier tous les modèles. Les algues photoautotrophes, mixotrophes et hétérotrophes peuvent être cultivées dans les systèmes fermés (Borowitzka, 1999). Les photobioréacteurs tubulaires (Figure 1.6) sont les plus faciles à utiliser à grande échelle en augmentant la longueur et le nombre des tubes (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012 ; Borowitzka, 1999 ; Muñoz et Guieysse, 2006). Ces photobioréacteurs sont constitués de tubes transparents en verre, en PVC et en plexiglas permettant l'accès de la lumière dans lesquels les algues

peuvent croître. Les diamètres des tubes sont limités de 24 mm à 24 cm et les diamètres étroits sont préférés pour avoir de meilleures propriétés hydrodynamiques et une meilleure productivité. À l'aide des pompes, les cultures d'algues peuvent circuler. Une unité d'échange de gaz fournit le CO_2 et retire l'oxygène photosynthétique. Ces systèmes permettent le contrôle de la température. Il faut ajouter que ces photobioréacteurs présentent quelques problèmes concernant le contrôle du CO_2 et de l' O_2 , le contrôle de la température et de la croissance des algues sur la surface interne des tubes qui affectent la productivité des algues (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012). L'efficacité de l'utilisation de la lumière dans les photobioréacteurs tubulaires est plus élevée que les autres (*flat plate*) parce que la surface du réacteur est plus grande par unité de surface occupée (Muñoz et Guieysse, 2006 ; Tredici et Zittelli, 1998).



Figure 1.6 Photobioréacteurs tubulaires représentant des tubes horizontaux (d'après Abdel-Raouf, Al-Homaidan, Ibraheem, 2012).

1.4 Problématique et objectif de recherche

1.4.1 Problématique

Les métaux sont des polluants persistants et le Cd représente l'un des métaux les plus toxiques pour la santé humaine en causant de graves dommages au système nerveux et aux reins (Bernard, 2011). Les déchets rejetés de l'industrie contribuent à la pollution des écosystèmes aquatiques par leurs teneurs en métaux comme le Cd. Ce métal non essentiel pour les processus physiologiques cellulaires peut être toxique chez les végétaux supérieurs et les algues à de faibles concentrations par leur fixation sur les groupes thiol (SH), le déplacement ou le remplacement des métaux essentiels à leurs sites moléculaires (Mason et Jenkins, 1995 ; Stoiber, Shafer et Armstrong, 2010). La phycoremédiation des eaux polluées en métaux implique l'élimination des ions non essentiels métalliques à partir du milieu à l'aide des microalgues. Les microalgues sont connues pour avoir la capacité d'absorber et de séquestrer en grande quantité des métaux dans leurs cellules. Cependant, les espèces d'algues ont une différence dans leur capacité à accumuler et à séquestrer les métaux (Baumann, Morrison et Stengel, 2009 ; Juneau, El Berdey et Popovic, 2002 ; Lavoie *et al.*, 2009 ; Nishikawa, Onodera et Tominaga, 2006 ; Perreault *et al.*, 2010). Tant que le métal est accumulé à l'intérieur de la cellule, les effets délétères induits par les ions métalliques toxiques peuvent limiter la capacité de la cellule à accumuler les métaux. Par ailleurs, le pH joue un rôle important pour la spéciation et la disponibilité des métaux pour les organismes aquatiques (Nishikawa et Tominaga, 2001). La disponibilité d'un métal dans le milieu acide est plus élevée, bien que la compétition des ions de H^+ puisse réduire et empêcher la liaison et le transport des métaux (Gadd, 2009). Par conséquent, pour la sélection des espèces d'algues les plus appropriées dans une approche d'assainissement des eaux usées, à la fois la capacité de la cellule à accumuler les métaux et sa tolérance contre les effets toxiques des métaux doivent être considérées avec les conditions du milieu telles que le pH et la température.

1.4.2 Objectif de recherche

Le principal objectif consiste à déterminer la bioaccumulation intracellulaire et les effets induits par les ions métalliques de cadmium chez les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas acidophila*. Notre hypothèse est que l'efficacité de bioaccumulation en Cd dépend de l'espèce, des conditions de pH, de la concentration et du

temps d'exposition en Cd. Donc, nos objectifs spécifiques sont : 1- La détermination de la bioaccumulation intracellulaire pour deux espèces d'algues vertes, *C. acidophila* et *C. reinhardtii*, lorsqu'elles sont exposées aux différentes concentrations de cadmium à pH 7 et pH 4; 2- La détermination des effets du Cd sur les fonctions cellulaires et biochimiques; 3- La détermination des avantages et des désavantages concernant les deux espèces pour une approche en assainissement des eaux usées.

CHAPITRE II

LA BIOCHIMIE DES ALGUES VERTES

2.1 La cellule végétale

Les organismes vivants sont capables de répondre à la contamination métallique par différents mécanismes moléculaires. Concernant les espèces isolées, cette question est toujours posée si elles peuvent croître en présence de métaux lourds ou non. Le mot «tolérance» de l'organisme peut être utilisé à la suite des propriétés structurales ou biochimiques, comme par exemple l'existence d'une paroi cellulaire imperméable, une bicouche de polysaccharides extracellulaire et l'excrétion (Gadd, 2009).

2.1.1 L'algue verte comme modèle d'étude

Chlamydomonas est un genre d'algue verte unicellulaire connu comme un organisme modèle qui possède un cycle simple de vie. On peut facilement isoler des mutants de cette espèce d'algue pour des études de génétique moléculaire. La Figure 2.1 montre une cellule de *Chlamydomonas* caractérisée par deux flagella, un chloroplaste entourant un ou plusieurs pyrénoides et une paroi cellulaire. La taille et la forme de l'organisme, la forme du chloroplaste et des pyrénoides, la longueur du flagelle ainsi que le nombre et la position des vacuoles sont différents entre les espèces de *Chlamydomonas* (Harris, 2001).

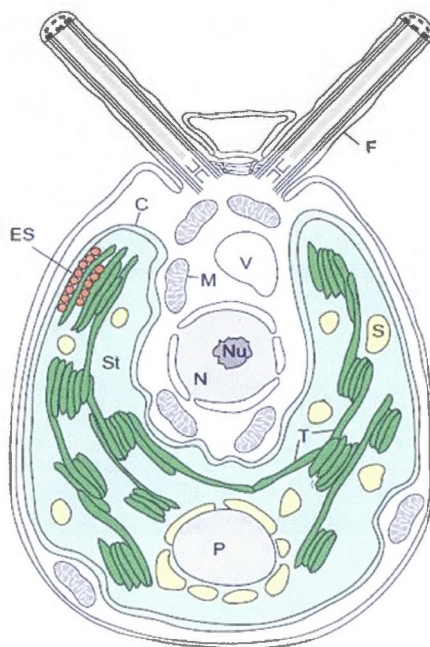


Figure 2.1 Représentation schématique d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii* ; V, vacuole ; F, flagella ; N, noyau ; Nu, nucléoles ; S, amidon ; P, pyrénoïde ; Es, ocelle ; C, chloroplaste ; St, stroma ; T, thylacoïde (d'après Dent, Han et Niyogi, 2001).

Chlamydomonas est un genre spécial concernant sa capacité de croissance rapide, soit hétérotrophe, soit photoautotrophe. Par conséquent, il est possible d'isoler les souches qui n'ont pas besoin de réaliser la photosynthèse (Davies et Grossman, 1998). De telles souches peuvent rapidement croître à l'obscurité ainsi que sous la lumière faible en présence d'une source de carbone comme l'acétate (Rochaix, 1995). D'après Davies et Grossman (1998), *Chlamydomonas* représente un modèle de grande valeur pour les études de la photosynthèse et, en mentionnant d'autres articles, ils ont expliqué les avantages de *Chlamydomonas* en comparant avec les plantes vasculaires et les cyanobactéries. La forme unicellulaire et la petite taille de *Chlamydomonas* facilitent les études biochimiques et biophysiques de la photosynthèse. *Chlamydomonas* possède un système de donneurs et d'accepteurs d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques. Aussi, c'est possible d'utiliser facilement les cultures liquides de *Chlamydomonas* pour les analyses de fluorescence et spectroscopiques. En exposant les cellules aux différentes conditions environnementales, les

conditions de croissance de *Chlamydomonas* peuvent être rapidement modifiées pour évaluer les effets environnementaux sur la photosynthèse. Par ailleurs, la culture de cellules de *Chlamydomonas* représente une population quasiment homogène. La transformation du génome est facile et introduire l'ADN est possible, soit dans le noyau, soit dans le génome chloroplastique (Davies et Grossman, 1998). Tous les paramètres expliqués ci-dessus justifient la sélection de différentes espèces de *Chlamydomonas* dans cette étude pour déterminer l'espèce la plus appropriée dans une application d'assainissement des eaux usées.

C. reinhardtii est connu comme un modèle biologique pour les études de la photosynthèse et l'étude des réponses d'adaptation au niveau cellulaire, physiologique, biochimique et moléculaire parmi les organismes photosynthétiques (Hanikenne, 2003 ; Mendez-Alvarez, Leisinger et Eggen, 1999). *C. reinhardtii* est un organisme eucaryote unicellulaire avec un taux de croissance rapide (le temps de duplication est moins de 10 h) et qui est capable de réaliser la photosynthèse ainsi que la croissance hétérotrophique. *C. reinhardtii* est un organisme haploïde, donc le phénotype se manifeste immédiatement et la transformation du génome nucléaire, mitochondrial et du chloroplaste est facile (Dent, Han et Niyogi, 2001). Le type sauvage de *C. reinhardtii* peut facilement croître dans le milieu liquide ou l'agar à pH neutre sans besoin de vitamines supplémentaires ou d'autres cofacteurs (Harris, 1989). L'acétate, comme une source de carbone, peut être utilisé par les souches du type sauvage et par conséquent la croissance peut se réaliser à l'obscurité. Pour le type sauvage, la croissance à la lumière avec ou sans acétate est plus rapide qu'à l'obscurité. La température optimale de croissance est de 20° à 25°C (Harris, 2001). Dans cette étude, nous avons choisi la température à 25°C avec un régime de lumière et d'aération en continue ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pour obtenir une concentration constante de CO_2 pour la croissance des cultures. La Figure 2.2 montre une cellule de *C. reinhardtii* soumise aux différents facteurs de stress comme une forte intensité lumineuse, les UV, le stress causé par les métaux ou les herbicides. La concentration des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans la cellule peut augmenter lors de l'exposition aux différents stress influençant les paramètres cellulaires. Différentes structures cellulaires participent à répondre aux stress par plusieurs voies de signalisation cellulaire (Mendez-Alvarez, Leisinger et Eggen, 1999).

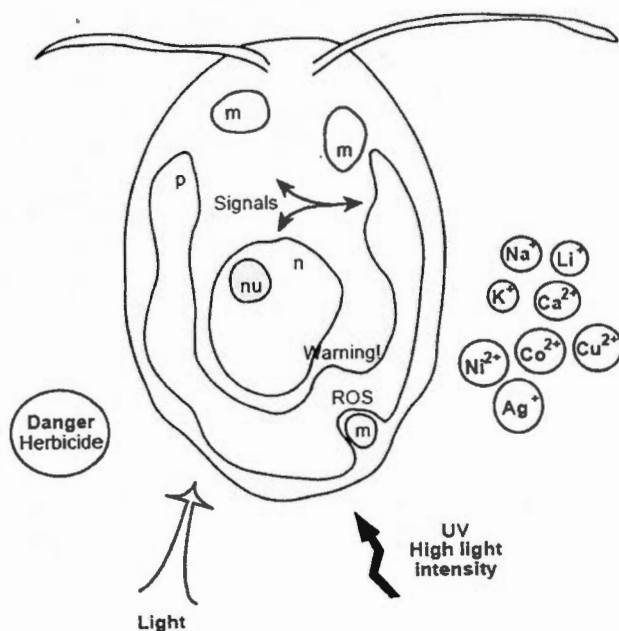


Figure 2.2 Représentation schématique d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii* soumise aux différents stress (d'après Mendez-Alvarez, Leisinger et Eggen, 1999).

Au contraire de *C. reinhardtii*, *C. acidophila* est obligatoirement un organisme photoautotrophe qui ne peut pas croître en présence de l'acétate et de citrate même sous illumination (Nishikawa et Tominaga, 2001). Dans cette étude, les mêmes conditions concernant le régime de lumière ont été choisies pour toutes les cultures. Les espèces *C. reinhardtii* et *C. acidophila* ont été cultivées sous deux différents pH (4 et 7) sous une illumination continue (60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pour faire toutes les analyses. Les études de Nishikawa et Tominaga (2001) ont montré que le pH optimal pour la croissance de *C. acidophila*, isolé du lac de Katanuma au Japon, était de 3.5-4.5. Aussi, ils ont observé que cette algue possède une morphologie similaire au genre de *Chlamydomonas*, deux flagella avec la même longueur, une paroi cellulaire, un pyrénoïde qui est entouré par une gaine d'amidon dans un chloroplaste. La morphologie générale de cette algue est montrée dans la Figure 2.3. Nishikawa et Tominaga en 2001 ont conclu que *C. acidophila* isolé du lac de Katanuma au Japon était *C. acidophila* Negoro. Les études de Gerloff-Elias et ses collègues (2006) ont montré que le pH intracellulaire de *C. acidophila* ne change pas dans le milieu

acide. Ils ont observé que le pH reste constant (7.5 - 7.8) dans le milieu acide pour une gamme de pH externe entre 1.5 - 7 (Gerloff-Elias *et al.*, 2006). Par ailleurs, *C. acidophila* a montré une tolérance élevée à plusieurs ions métalliques (Nishikawa et Tominaga, 2001 ; Perreault *et al.*, 2010 ; Spijkerman *et al.*, 2007).

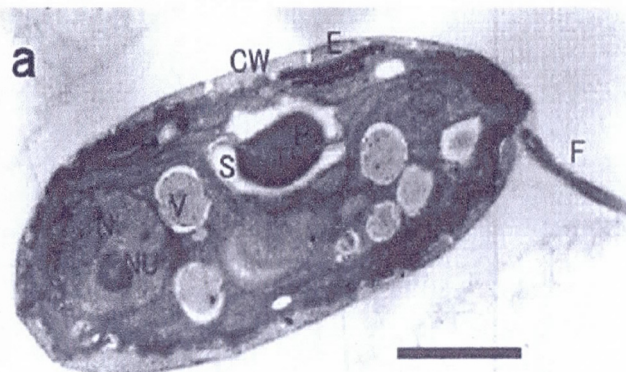


Figure 2.3 La morphologie générale de *C. acidophila* isolée à partir du lac de Katanuma au Japon. CW, paroi cellulaire; V, vacuole; F, flagella ; N, noyau ; NU, nucléoles ; S, amidon (d'après Nishikawa et Tominaga, 2001).

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de deux espèces de *Chlamydomonas* pour une application en assainissement des eaux usées dans le but de sélectionner l'espèce la plus résistante au Cd. Le phénotype sauvage de *C. reinhardtii* (CC-125) en termes de réponse au Cd a été choisi par rapport aux autres espèces de *C. reinhardtii* qui ne contiennent pas de paroi cellulaire. En effet, il a été démontré que la paroi cellulaire peut agir comme une barrière pour l'absorption des métaux (Cd) à des concentrations faibles chez des cellules d'algues de *C. reinhardtii* (Macfie, Tarmohamed et Welbourn, 1994). *C. acidophila*, l'espèce CPCC-121, utilisée pour cette recherche a été isolée au Canada. CPCC-121 a l'avantage d'avoir un pH optimal de croissance similaire à celui de *C. reinhardtii* tout en montrant une bonne tolérance à de faibles pH (pH=4). Les deux espèces sont également capables de croître

au même pH (pH=7). Il faut noter que l'utilisation de *C. acidophila*, un organisme métal-résistant n'a pas été encore évalué pour les applications d'assainissement des eaux polluées.

2.1.2 Les mécanismes des effets toxiques du Cd au niveau cellulaire

Les métaux non-essentiels pouvaient faire des liaisons inappropriées aux groupements fonctionnels et essentiels des biomolécules (ex: acides nucléiques) en entraînant des effets toxiques. Par exemple, le cadmium présente une forte affinité avec les groupes sulfhydriques. Le déplacement ou le remplacement des métaux essentiels par le Cd à leurs sites actifs, en particulier le Zinc provoque une modification de la conformation et donc de l'activité de la biomolécule (Mason et Jenkins, 1995 ; Stoiber, Shafer et Armstrong, 2010). Dans une étude antérieure, Küpper et ses collègues (1996) ont trouvé que les métaux lourds (mercure, cuivre, cadmium, etc.) pouvaient remplacer le magnésium, un métal essentiel de la chlorophylle causant une altération du fonctionnement de la photosynthèse chez des plantes aquatiques (Küpper, Küpper et Spiller, 1996). Faller et ses collègues (2005) ont suggéré que le Cd^{2+} peut se lier de manière compétitive au site essentiel du Ca^{2+} dans le PSII pendant la photoactivation, causant l'inhibition de la photolyse de l'eau (Faller, Kienzler et Krieger-Liszkay, 2005). Le fonctionnement du Ca dans la cellule peut être influencé par le Cd de façon compétitive ou en bloquant son absorption à l'intérieur de la cellule (Benavides, Gallego et Tomaro, 2005).

Le Cd peut influencer le taux de croissance, altérer la photosynthèse et modifier la structure cellulaire comme la taille et la granulosité chez les cellules d'algues. La densité cellulaire des cellules de *C. reinhardtii* a été diminuée pendant une période de 10 jours d'exposition aux concentrations de 50 et 100 μM de Cd, et cette diminution était plus moindre chez les cellules de type sauvage possédant une paroi cellulaire par rapport aux cellules sans paroi cellulaire (Prasad *et al.*, 1998). Un effet du Cd sur la croissance de l'algue de *Tetraselmis gracilis* a été présenté par les études d'Okamoto et ses collègues (1996). Ils ont observé que des concentrations moins élevées de Cd (1 ppm ou moins) ne montrent pas un effet toxique sur la croissance de *T. gracilis*, mais en augmentant la concentration de Cd, la croissance exponentielle a été diminuée pendant 10 jours d'exposition (Okamoto *et al.*, 1996). L'augmentation de la taille cellulaire a été montrée par les recherches de Jamers et ses collègues (2009) lorsque *C. reinhardtii* a été exposé 72 h à 5 μM de Cd. Visviki et Rachlin

(1994) ont observé une augmentation du volume cellulaire égale à 70% par rapport au contrôle chez *Dunaliella salina* lors d'une exposition aiguë à 4,55 μM de Cd et cette valeur était égale à 49,7 % chez *Chlamydomonas bullosa* lors d'une exposition à 0,025 μM de Cd.

Les vacuolisations cytoplasmiques, le développement des organites membraneux, l'accumulation des lipides, l'accumulation de l'amidon ont été détectés en réponse à l'action toxique des métaux chez les algues et les protozoaires. Nassiri et ses collègues (1997) ont montré la vacuolisation du cytoplasme et du chloroplaste chez la diatomée marine *Skeletonema costatum* exposée aux concentrations de 0,2, 0,5 et 1 mg/L de Cd. La vacuolisation cytoplasmique a été observée chez *C. bullosa* lors de l'exposition chronique aux concentrations moins élevées de Cd (Visviki et Rachlin, 1994). Le nombre et le volume de vacuoles cytoplasmiques ont été augmentés chez *Chlamydomonas sp* lors de l'exposition à 0,2 mM de Cd (Aguilera et Amils, 2005). L'apparition de granules a été observée chez un protozoaire cilié (Martín-González *et al.*, 2006), chez *Skeletonema costatum* (Nassiri *et al.*, 1997) et chez *Chlamydomonas sp* (Aguilera et Amils, 2005) lors de l'exposition au Cd. L'espace de periplasmalemma a été significativement augmenté chez *Chlamydomonas sp* lors de l'exposition à 0,2 mM de Cd et le volume le plus élevé a été détecté chez les cellules traitées avec 0,4 mM de Cd. Aguilera et Amils (2005) ont expliqué cette augmentation à la présence d'un grand nombre de vacuoles. Le développement des organites membraneux a été trouvé chez *Chlamydomonas bullosa* comme une réponse au stress de Cd et de Cu (Visviki et Rachlin, 1994). Les dommages cellulaires tels que l'augmentation de la taille des granules d'amidon, des vacuoles et des chloroplastes, la diminution des structures pyrénoides et de la taille mitochondriale ainsi que la formation de nouvelles structures dans les vacuoles, ont été indiqués chez *C. acidophila* lors du traitement au Cd (20 μM) pendant 3 jours (Nishikawa *et al.*, 2003). Une augmentation significative dans le nombre et le volume relatif des granules d'amidon a été détectée chez *Chlamydomonas sp* lors de l'exposition à 0,1 et 0,2 mM de Cd (Aguilera et Amils, 2005). Visviki et Rachlin (1994) ont rapporté l'accumulation de lipides chez *Dunaliella salina* exposé à la concentration sublétales de Cd (4,55 μM Cd^{2+}) et ils ont supposé que cette accumulation était en raison de la limitation nutritive induite par le Cd. Les constituants structurels ou fonctionnels de la paroi cellulaire liés aux groupes anioniques de la

membrane plasmique peuvent être influencés par l'exclusion (Gimmler, Jesus et Greiser, 2001a).

Une diminution du rendement maximal du PSII d'une manière dépendante de la concentration a été démontrée chez *C. reinhardtii* exposé aux différentes concentrations de Cd pendant 24 h (Perreault *et al.*, 2011). Ils ont rapporté que le Cd peut influencer la photolyse de l'eau et le PSI causant une réduction de la capacité du transport d'électrons photosynthétiques des photosystèmes II et I. L'altération de l'efficacité du transport d'énergie à partir des antennes collectrices de chlorophylles au centre réactionnel du PSII a été démontrée chez *Scenedesmus obliquus* exposé au Cd (Mallick et Mohn, 2003). Ils ont montré que la photolyse de l'eau est le site d'action primaire du Cd. Une exposition à court terme à 0,3 mM de Cd a inhibé l'activité photosynthétique des cellules de *C. reinhardtii*, tandis que la respiration est restée élevée même après 24 h d'exposition (Vega *et al.*, 2006).

2.1.3 Les indicateurs cellulaires et biochimiques des effets toxiques du Cd

Plusieurs paramètres ont été analysés pour étudier les effets toxiques du cadmium chez les cellules d'algues comme la division cellulaire, les réactions photochimiques de la photosynthèse et la structure cellulaire. En présence de Cd, la diminution de la densité cellulaire ainsi que les changements de la taille ont été rapportés par quelques recherches (sous section 2.1.2). Il faut ajouter que l'augmentation de la taille cellulaire a été observée pour d'autres métaux comme le cuivre chez *Chlorella sp.*, *S. capricornutum*, *P. tricornutum* (Franklin, Stauber et Lim, 2001b) et *Dunaliella tertiolecta* (Abalde *et al.*, 1995). Les études de Franqueira et ses collègues (2000) ont indiqué une augmentation de la taille des cellules de *P. tricornutum* exposées au cuivre. D'autres polluants comme les herbicides isoproturon et terbutryne ont causé une augmentation significative de la taille des cellules de *Chlorella vulgaris* (Rioboo *et al.*, 2002).

On a aussi rapporté l'altération de l'activité photosynthétique des cellules de *C. reinhardtii* et *Scenedesmus obliquus* lors du traitement au Cd (Faller, Kienzler et Krieger-Liszky, 2005 ; Mallick et Mohn, 2003 ; Perreault *et al.*, 2011 ; Vega *et al.*, 2006).

2.1.4 Les mécanismes de réponse au stress envers le Cd

En réponse au stress envers le Cd, les cellules végétales peuvent faire appel à plusieurs mécanismes de défenses, tels que l'exclusion, la synthèse des phytochélatines, la séquestration dans la vacuole, la synthèse des protéines de stress et les changements ultrastructuraux (Clemens, 2001 ; Gimmler *et al.*, 1991 ; Hu, Lau et Wu, 2001 ; Nassiri *et al.*, 1997 ; Pal et Rai, 2010 ; Spijkerman *et al.*, 2007 ; Visviki et Rachlin, 1994).

2.1.4.1 Mécanismes de distribution cellulaire des métaux

Les espèces d'algues peuvent contrôler les concentrations internes des métaux essentiels par des mécanismes efficaces du contrôle homéostatique. Il a été observé que la détoxification cellulaire des métaux non essentiels contrôle l'absorption, la chélation, la distribution et la séquestration des métaux. En fait, après l'absorption par les transporteurs, les ions métalliques non essentiels sont liés par les chélateurs et les protéines de stress. Les agents chélatants fixent les métaux à l'état de complexes solubles et permettent leur élimination. La détoxification et le stockage d'un métal non essentiel sont réalisés par leur séquestration dans la vacuole (Figure 2.4) (Clemens, 2001).

En fait, les cellules végétales se développent avec différents mécanismes moléculaires de tolérance pour contrôler la disponibilité des métaux, en particulier ceux qui sont considérés biologiquement comme des éléments non essentiels tels que le Cd (Benavides, Gallego et Tomaro, 2005 ; Gallego *et al.*, 2012 ; Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999).

2.1.4.2 Mécanismes de résistance des espèces acidophiles dans le milieu acide

Le potentiel zêta positif et les potentiels membranaires influencent les forces de répulsion envers les cations entraînant la diminution du flux de protons à partir du milieu vers les cellules (Gimmler, Jesus et Greiser, 2001a). Gimmler et ses collègues (1991) ont rapporté le rôle du potentiel zêta positif comme un mécanisme efficace de protection contre les effets toxiques des métaux lourds chez l'algue *Dunaliella acidophila*. Cette espèce possède un pH de croissance optimal de 1 avec l'absence d'une paroi cellulaire rigide. En conséquence, il y a un manque d'une forte résistance contre les métaux lourds par la liaison des ions métalliques à la paroi cellulaire.

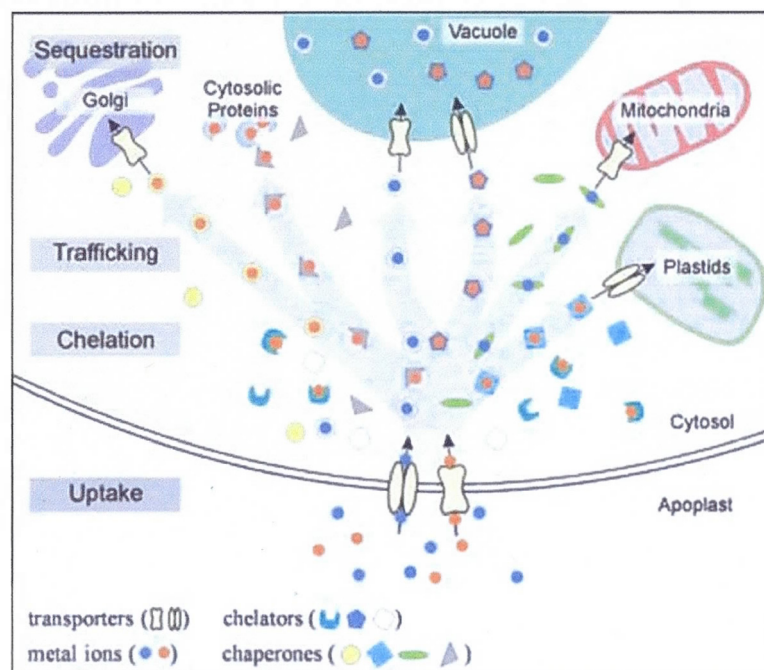


Figure 2.4 Mécanismes de distribution cellulaire des métaux (d'après Clemens, 2001).

Pour le champignon acidophile *Bispora sp*, un mécanisme similaire à pH 1 a été représenté par Gimmler et ses collègues (2001a), et l'inhibition de la croissance par les métaux lourds cationiques à faible pH était moins qu'à pH neutre. Bien qu'ils n'aient pas mesuré le potentiel zêta de *Bispora sp*, ils ont supposé que le potentiel de membrane serait négatif à pH=7. En tenant compte d'autres travaux et de leurs recherches (1991), ils ont considéré que toutes les espèces acidophiles possèdent un potentiel zêta positif. Par conséquent, une résistance aux métaux lourds et aux milieux acides a été observée chez *Dunaliella acidophila*. Les cations ont causé une élévation du potentiel zêta positif de *Dunaliella acidophila* à faible pH, mais son potentiel zêta négatif à pH 7 a été diminué en raison de la liaison des cations à la membrane plasmatique. Donc, la photosynthèse de *Dunaliella acidophila* n'a pas été affectée par les cations (métaux lourds) à pH acide, mais à pH 7, l'inhibition de la photosynthèse a été observée par l'effet de 3 mM de Al^{3+} et de 3 - 30 mM de Cd^{2+} (Gimmler *et al.*, 1991).

Parent et Campbell ont rapporté (1994) les effets toxiques des ions Al^{3+} sur la croissance de *Chlorella pyrenoidosa* qui ont été diminués en raison de la compétition des ions H^+ avec les ions Al^{3+} pour la liaison à la surface cellulaire (Parent et Campbell, 1994). Perreault et ses collègues ont démontré (2010) que *C. acidophila* peut maintenir sa physiologie cellulaire à un pH faible et en présence d'une forte concentration de Al. Ils ont montré un effet différent de Al sur la division cellulaire et dépendant du pH.

Gerloff-Elias et ses collègues ont suggéré (2006) que les protéines de choc thermique (Hsps) jouent un rôle dans l'adaptation de *C. acidophila* à un faible pH. Ils ont rapporté un pH intracellulaire de 7,5 – 7,8 chez *C. acidophila* exposé aux conditions acides entre 1,5 et 7. Il a été démontré qu'il existe plusieurs familles de Hsps, de sorte que Hsp70 et Hsp60 sont présents dans la cellule en absence de stress, responsable du repliement de protéine et de translocation (Hartl, 1996). Les sHsps (*small heat shock proteins*) sont synthétisés en présence d'un stress physiologique (Laksanalamai et Robb, 2004 ; Wang *et al.*, 2004). Gerloff-Elias et ses collègues ont trouvé (2006) que l'accumulation de Hsp70, Hsp60 et sHsp chez *C. acidophila* était plus élevée à un faible pH. De plus, *C. acidophila* a présenté une accumulation plus grande de Hsp70 et de Hsp60 que *C. reinhardtii* dans les conditions normales (à pH neutre). En particulier, ce qui est important concernant les sHsps, c'est qu'elles n'ont pas été détectées chez *C. reinhardtii* dans les conditions normales. Tous les cas montrent l'adaptation de *C. acidophila* à l'environnement naturel. Chez *C. acidophila*, le taux de croissance et le rendement de fluorescence n'ont pas été affectés sur la gamme de pH entre 2,6 et 5 (sauf à pH 4). À un pH de 1,5 et de 7, tous les paramètres ont été significativement réduits représentant les limites inférieures et supérieures de la tolérance au pH chez *C. acidophila*. Ils ont aussi observé l'agrégation des cellules de *C. acidophila* ou autospores et par conséquent une augmentation de la taille des cellules donnant une réponse adaptative de *C. acidophila* à l'environnement acide.

Les mécanismes mentionnés ci-dessus indiquent le rôle du potentiel zêta, la compétition des ions de H^+ avec les ions métalliques pour la liaison à la surface algale et le rôle des protéines de choc thermique (Hsps) dans l'adaptation des algues acidophiles aux conditions acides. Il a été démontré qu'en augmentant le pH externe, le potentiel électrique à travers la membrane plasmique de *Dunaliella acidophila* est devenu négatif augmentant le

flux de proton du milieu externe vers le milieu intracellulaire (Gimmler, 2001b ; Remis, Simonis et Gimmler, 1992). Remis et ses collègues ont montré (1992) le point d'inversion du potentiel de la membrane à un pH externe de 4. Une diminution significative du pH intracellulaire due au pH externe de 4 chez *C. acidophila* a été rapportée par Gerloff-Elias et ses collègues (2006) et ils ont suggéré comme explication le même mécanisme que celui ci-dessus. Dans le pH externe de 4, ils ont obtenu des résultats différents indiquant la diminution du taux de croissance et du rendement de fluorescence ainsi qu'une accumulation significative des sHsps qui a été liée à l'acidification interne de *C. acidophila* pour l'aider à faire face au stress associé à un faible pH.

2.1.4.3 Le rôle de la paroi et de la membrane cellulaire contre les effets toxiques des métaux

D'après les travaux antérieurs, la paroi et la membrane cellulaire peuvent jouer un rôle important pour la protection des cellules d'algues à l'action des effets toxiques des métaux. Les résultats obtenus par les études de Collard et Matagne (1990) ont montré que la paroi cellulaire indique une forte affinité pour la formation de complexes aux cations de Cd chez *C. reinhardtii* entraînant une résistance au Cd par rapport à la souche sans paroi cellulaire (Collard et Matagne, 1990).

Le rôle de la paroi cellulaire sur les effets toxiques des métaux Cd, Co, Cu et Ni chez *C. reinhardtii* a été vérifié par les études de Macfie et ses collègues (1994). Ils ont rapporté que l'espèce possédant une paroi cellulaire avait une densité cellulaire plus élevée que l'espèce sans paroi cellulaire pour chaque concentration de métaux mentionnés ou chaque pH (5 et 6,8). Ils ont conclu que les sites situés à l'intérieur ou à la surface de la paroi cellulaire présentent une capacité à lier les ions métalliques et empêcher leurs absorptions dans la cellule. Leurs études ont démontré l'importance de la membrane plasmique pour la protection des cellules de *C. reinhardtii* exposées aux différents métaux. Les valeurs obtenues pour la EC₃₀ ont montré aucune différence significative concernant les effets toxiques des métaux (Cd, Co, Cu et Ni) entre les deux espèces (avec et sans la paroi cellulaire) au même pH (5 ou 6,8). Malgré qu'à un faible pH (5), les effets toxiques des métaux étaient moins chez les deux espèces, mais il n'existait pas de différence dans les valeurs de EC₃₀ entre les deux espèces au même pH. Donc, ils ont suggéré que la compétition des ions de H⁺ pour se lier aux sites de la paroi cellulaire n'était pas la seule raison de la réduction de toxicité. En effet, la différence de

toxicité observée entre les métaux était liée à une forte compétition pour les liaisons ioniques sur la membrane plasmique, c'est-à-dire les sites de liaison sur la paroi cellulaire en combinaison avec la membrane plasmique (Macfie, Tarmohamed et Welbourn, 1994). Il faut ajouter que l'accumulation de Cd était moins chez *C. reinhardtii* sans paroi cellulaire que l'espèce possédant la paroi cellulaire. Ces deux espèces ont présenté une accumulation comparable et relativement élevée des ions de Cu, tandis que l'espèce possédant la paroi cellulaire était plus tolérante indiquant l'importance d'autres mécanismes de protection cellulaire (Macfie et Welbourn, 2000).

2.1.4.4 La synthèse des phytochélatines et la détoxification des ions métalliques

Les phytochélatines (PC_s) ont été isolées et purifiées pour la première fois par Grill et ses collègues (1985). La phytochélatine est composée de trois acides aminés, la glutamine (Glu), la cystéine (Cys) et la glycine (Gly). Les phytochélatines forment une famille de structures avec la répétition des unités dipeptides de Glu-Cys et terminé par Gly. Donc, la structure générale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ a été proposée pour les phytochélatines où "n" est compris entre 2 et 11 (Grill, Winnacker et Zenk, 1985 ; Rauser, 1995). La Figure 2.5 montre la structure chimique de la phytochélatine (Pal et Rai, 2010) et la Figure 2.6 indique le cas particulier de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ (Cruz *et al.*, 2002).

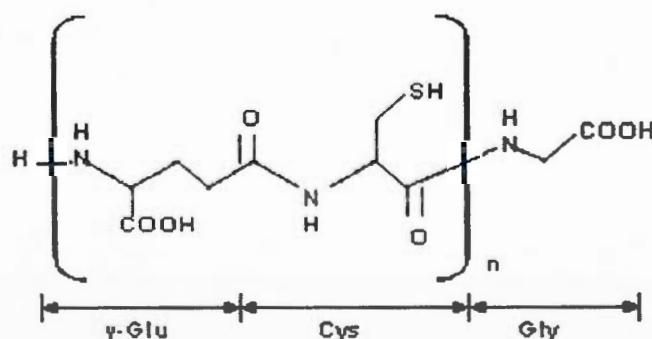


Figure 2.5 La structure chimique de la phytochélatine (d'après Pal et Rai, 2010).

Il a été rapporté que les phytochélatines ont été apparues lors de l'induction des cellules végétales par les métaux lourds tels que le cadmium, le zinc, le cuivre, le plomb et le mercure et elles ont été impliquées dans la détoxification et le métabolisme des ions métalliques. En

raison de la présence des groupements thiols des cystéines, les phytochélatines sont capables de former quelques complexes avec le Cd qui empêche la circulation des ions libres du Cd dans le cytosol (Grill, Winnacker et Zenk, 1985).

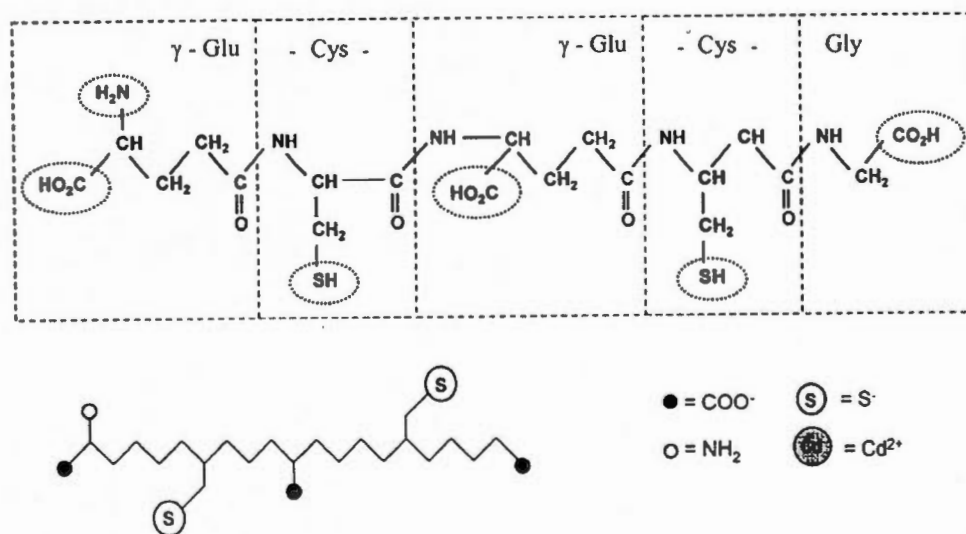


Figure 2.6 Schéma représentant la phytochélatine (γ-Glu-Cys)₂-Gly (d'après Cruz *et al.*, 2002).

À partir d'une seule ou de plusieurs molécules de PC_s, il est possible de former différentes liaisons du complexe PC-Cd avec les ratios de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1. La Figure 2.7 montre l'interaction des phytochélatines avec les ions de cadmium (Cruz *et al.*, 2002 ; Kobayashi et Yoshimura, 2006 ; Pal et Rai, 2010).

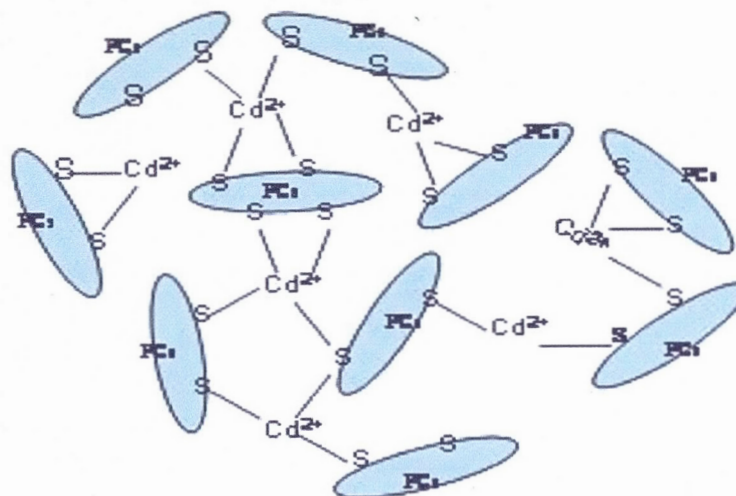


Figure 2.7 Interaction des phytochélatines avec les ions de cadmium (d'après Pal et Rai, 2010).

Les phytochélatines sont formées à partir du glutathion en présence des ions métalliques, suite à l'intervention d'une enzyme, la γ -glutamylcystéine dipeptide transpeptidase (phytochélatine synthétase) (Grill *et al.*, 1989). La Figure 2.8 montre la voie de la synthèse des phytochélatines (Lagadic *et al.*, 1998). Le rôle du glutathion pour la formation des phytochélatines a été examiné en ajoutant une substance inhibant la synthèse du glutathion, la buthionine sulfoximine (Grill, Winnacker et Zenk, 1987). Ils ont observé que le niveau de la formation des phytochélatines avait diminué en présence de différentes concentrations de buthionine sulfoximine. En fait, la buthionine sulfoximine est un inhibiteur de l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase, intervenant dans la synthèse du glutathion.

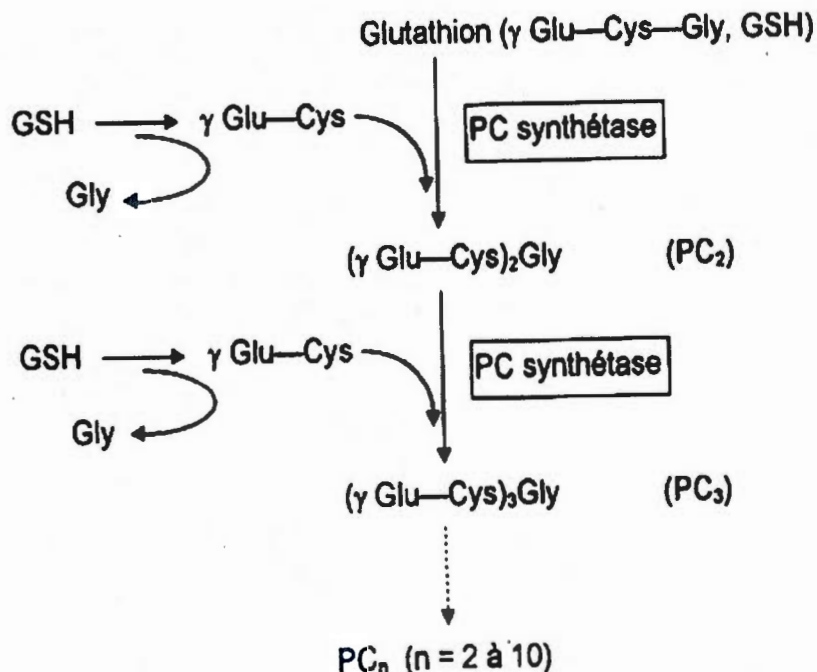


Figure 2.8 La voie de la synthèse des phytochélatines. GSH, glutathion; PC, phytochélatine; PC_s, phytochélatine synthétase (d'après Lagadic *et al.*, 1998).

La Figure 2.9 montre la structure chimique du glutathion (Pal et Rai, 2010). Le glutathion (GSH) protège les cellules en réduisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et également en se liant aux métaux. La voie de la biosynthèse du glutathion au niveau enzymatique a été montrée dans la Figure 2.10. Dans la première étape, la production de γ -glutamylcystéine par le L-glutamate se déroule et la L-cystéine est catalysée par γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS). Dans la deuxième étape, l'addition de la glycine est catalysée par l'enzyme glutathion-synthétase (GS) pour produire le GSH. Le niveau de GSH reste élevé grâce à l'intervention de l'enzyme glutathion réductase (GR) dans la réduction du glutathion oxydé (GSSG) qui est essentiel pour maintenir le potentiel redox du cytoplasme cellulaire (Stoiber, Shafer et Armstrong, 2010).

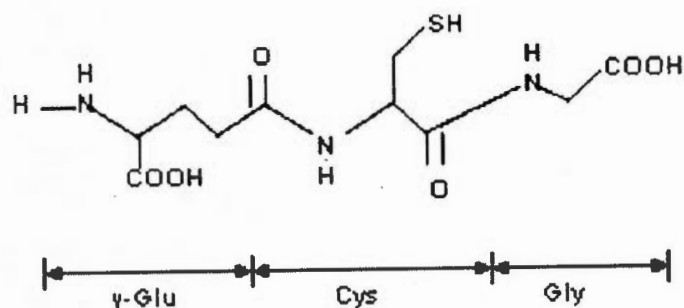


Figure 2.9 La structure chimique du glutathion (d'après Pal et Rai, 2010).

Par conséquent, la Figure 2.11 montre la détoxification et le métabolisme des métaux non essentiels qui se fait premièrement par l'activation de la synthèse des phytochélatines à la suite d'une augmentation des concentrations intracellulaires en métaux lourds et ensuite par la chélation des ions métalliques avec de nouvelles phytochélatines synthétisées (Howe et Merchant, 1992).

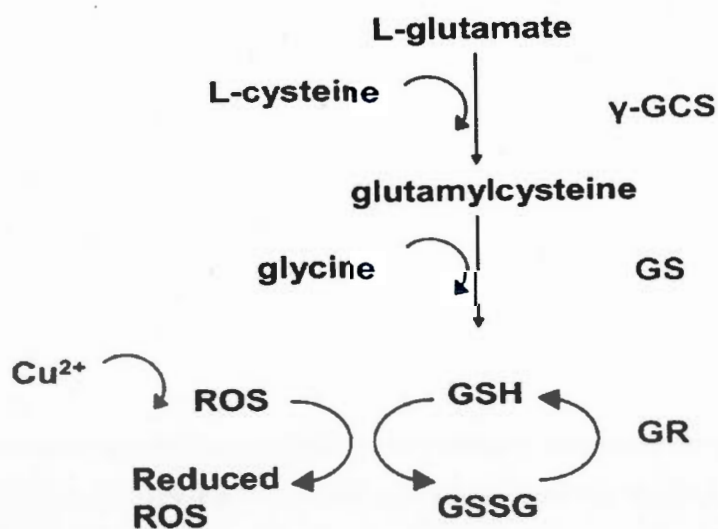


Figure 2.10 La voie de la biosynthèse du glutathion (d'après Stoiber, Shafer et Armstrong, 2010).

Nishikawa et ses collègues ont évalué (2006) la relation entre le métabolisme des phytochélatines et l'accumulation de Cd en utilisant deux espèces de *C. acidophila*, KT-1 et DVB238. Leurs résultats ont été comparés avec *C. reinhardtii* C-9. Comme il a été déjà mentionné, *C. acidophila* a été représenté comme une espèce de *Chlamydomonas* résistante aux métaux (Nishikawa et Tominaga, 2001). Leurs résultats ont démontré que l'espèce DVB238 a accumulé plus de Cd (50,07 μg de Cd/mg de poids sec) que les autres espèces, *acidophila* KT-1 et *C. reinhardtii* C-9 (moins de 1 μg de Cd/mg de poids sec). Cependant, le total des phytochélatines était presque le même chez trois espèces : lorsque *C. acidophila* KT-1 et *C. acidophila* DVB238 ont été traités avec 60 μM de Cd pendant 4 jours, et lorsque *C. reinhardtii* C-9 a été traité avec une faible concentration de 6 μM de Cd pendant 4 jours. Il semble que le niveau total de phytochélatines n'était pas nécessairement lié à l'accumulation de Cd chez les espèces de *Chlamydomonas*. Les images obtenues par la microscopie électronique à transmission (TEM) n'ont pas montré une augmentation dans les granules d'amidon chez *C. acidophila* DVB238 malgré une grande accumulation de Cd dans le cytosol et le chloroplaste, tandis qu'une forte augmentation de granules d'amidon dans les chloroplastes des deux espèces *C. reinhardtii* C-9 et *C. acidophila* KT-1 indiquant une altération cellulaire. Au contraire, *C. acidophila* DVB238 a présenté une activité plus élevée de l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) que celle de *C. acidophila* KT-1 dans les mêmes conditions examinées. On a déjà mentionné que l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) joue un rôle important dans la biosynthèse du glutathion (GSH). Les études de Stoiber et ses collègues (2010) ont démontré que le cadmium est un inducteur qui fait augmenter les concentrations de glutathion. Donc, l'activité plus élevée de l'enzyme γ -GCS a causée un niveau élevé de GSH chez *C. acidophila* DVB238 lors de l'exposition au Cd, et par conséquent, c'est la raison essentielle de la tolérance contre les effets toxiques de Cd.

En revanche, Lavoie et ses collègues ont mesuré (2009) des quantités constantes de GSH et ils ont trouvé différents oligomères de phytochélatines synthétisées dépendant de la concentration de Cd. L'augmentation des concentrations de Cd, proche de la CE_{50} (221 et 253 nM de Cd^{2+}), chez *C. reinhardtii* a conduit à une plus grande synthèse des oligomères de phytochélatines, c'est-à-dire PC_4 et PC_5 , tandis que l'exposition à 149 nM de Cd^{2+} chez *P. subcapitata* a conduit à une plus grande synthèse de PC_3 .

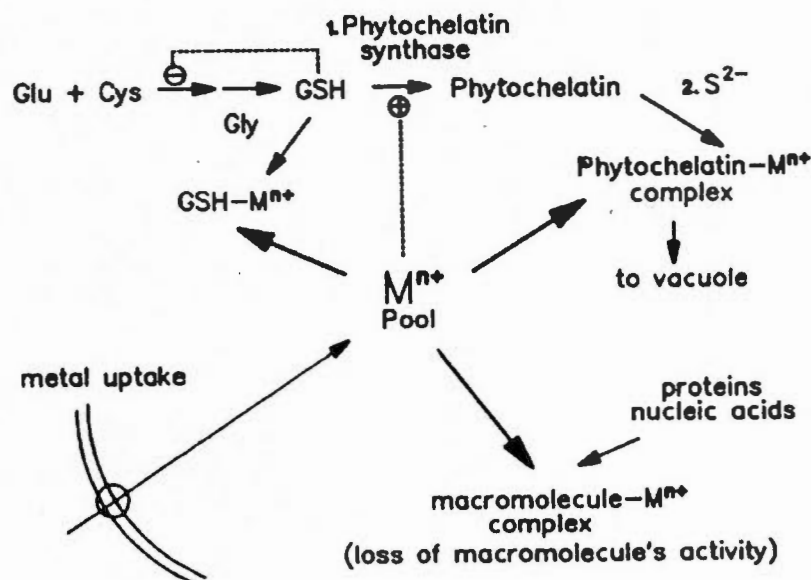


Figure 2.11 Un modèle représentant la détoxification et le métabolisme des métaux non essentiels, M^{n+} représente un métal (d'après Howe et Merchant, 1992).

Conformément aux autres articles qui expliquent l'augmentation de la stabilité des complexes Cd-phytochélatines avec l'augmentation de la chaîne des phytochélatines, ils ont supposé qu'une résistance plus élevée de *C. reinhardtii* contre le Cd par rapport à *P. subcapitata* était le résultat de la présence des oligomères plus polymérisés. Ils ont également observé la synthèse de plusieurs composés thiolés non identifiés (X_n) chez les deux espèces. Ils ont mentionné plusieurs structures de peptides (dipeptidyle ou tripeptidyle) associées à la synthèse de la phytochélatine. Ils ont suggéré que certains peptides synthétisés (X_n) pourraient correspondre à l'une de ces deux classes, mais le sujet le plus important était la synthèse des peptides (X_n) chez *C. reinhardtii* exposés au cadmium par rapport à *P. subcapitata* entraînant une résistance plus élevée contre le Cd. L'efficacité des protéines thermostables et des peptides de liaison au Cd intracellulaire a été évaluée par la mesure de l'accumulation de Cd dans la fraction de Hsp de sorte que, pour les deux espèces, des proportions élevées ont été observées lors de l'exposition aux concentrations fortes de Cd. À la fin de la période de l'exposition, *C. reinhardtii* a accumulé plus de Cd par cellule que *P. subcapitata*, mais l'espèce *P. subcapitata* a synthétisée plus de PC_{2-6} par Cd intracellulaire

indiquant que la quantité de phytochélatines synthétisés ne pouvait pas s'expliquer seulement par l'accumulation de Cd. Les ratios totaux de peptides thiolés (phytochélatines et peptides inconnus X_{1-6}) au Cd intracellulaire ou au Cd_{HSP} étaient également plus élevés chez *P. subcapitata*, en particulier aux concentrations moins élevées de Cd, cela indique que *C. reinhardtii* était une espèce productrice faible de phytochélatines, mais plus résistante au Cd. Ils ont suggéré que la différence dans l'accumulation de Cd entre les deux espèces pourrait être due au taux d'absorption plus élevé de cadmium chez *C. reinhardtii* ou de l'affinité plus élevée de *P. subcapitata* pour l'exclusion du Cd des cellules. Mais la grande tolérance de *C. reinhardtii* a indiqué que les mécanismes de détoxification intracellulaire du Cd qui étaient plus importants que l'exclusion (Lavoie *et al.*, 2009).

2.1.4.5 La séquestration des métaux dans la vacuole

La séquestration vacuolaire empêche la circulation des ions de Cd dans le cytosol. Hu et ses collègues (2001) ont rapporté la formation de deux types de complexe PC-Cd chez *C. reinhardtii*, un complexe de faible poids moléculaire (LMW) qui est formé rapidement après l'exposition au Cd et un complexe de haut poids moléculaire (HMW) à partir de la conversion rapide du complexe LMW à HMW. En fait, ils ont mentionné que le complexe HMW a été formé par l'ajout de sulfure au complexe LMW. Speiser et ses collègues (1992) ont rapporté que *Brassica juncea* a formé un complexe de haut poids moléculaire PC-Cd-S²⁻ en réponse au stress envers le Cd. Ils ont suggéré que la réduction du sulfate a fourni un flux accru de soufre permettant à la fois la synthèse plus élevée de la phytochélatine et la production de S²⁻ pour la formation du complexe PC-Cd-S²⁻ (Speiser *et al.*, 1992). Donc, le complexe de haut poids moléculaire (HMW) est très stable par les groupes de S²⁻ et joue un rôle essentiel pour le stockage de Cd dans la vacuole pendant le processus de la détoxification. Comme les études de Hu et ses collègues (2001) montrent la présence des groupes de S²⁻ permettant une séquestration plus élevée de Cd et aussi une stabilité plus élevée du complexe PC-Cd (Hu, Lau et Wu, 2001). La Figure 2.12 montre le schéma représentant des mécanismes impliqués dans la chélation du Cd et sa séquestration dans la vacuole (Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999).

incubé dans l'eau du lac était plus élevé par rapport au milieu enrichi en Zn et le témoin, mais plus faible que le milieu enrichi en Fe. Ils ont suggéré que le niveau élevé de Hsp était l'une des raisons de la tolérance aux métaux. Ils ont trouvé que le rendement photosynthétique a été diminué pour toutes les espèces incubées dans les échantillons du lac contenant différents niveaux de Zn et Fe. Ils ont supposé que de hautes concentrations de Fe et son interaction avec le P était le facteur principal du stress et que des niveaux élevés de Zn ou Fe n'était pas la seule raison de la réduction de la productivité primaire dans les lacs miniers, conformément au niveau élevé de Hsp et son rôle pour la tolérance aux métaux.

2.1.4.7 Les changements ultrastructuraux due aux effets toxiques des métaux

Les vacuolisations cytoplasmiques, le développement des organites membraneux, l'accumulation des lipides, l'accumulation de l'amidon et l'accumulation cytoplasmique de granules en réponse à l'action toxique des métaux chez les algues et les protozoaires ont été rapportés.

Nassiri et ses collègues (1997) ont montré une vacuolisation du cytoplasme et du chloroplaste chez la diatomée marine *Skeletonema costatum* exposée aux différentes concentrations de Cd et de Cu. Le Cd et le Cu ont été séquestrés seulement dans les inclusions vacuolaires sphériques. Après le traitement avec le Cd, le volume des inclusions sphériques a été augmenté. Ces inclusions vacuolaires denses ont été enrichies en soufre et azote et les auteurs ont suggéré que le Cd s'est lié probablement aux molécules organiques par les liaisons S-Cd réduisant les concentrations de Cd du cytosol. L'apparition des granules ou des inclusions a aussi été démontrée chez le protozoaire cilié exposé aux concentrations sublétales de Cd et de Zn (Martín-González *et al.*, 2006). Ils ont supposé que ces granules ou ces inclusions pourraient se former dans les vacuoles pour s'étendre plus ou moins uniformément faisant disparaître la vacuole originale. Ces granules forment des complexes aux cations métalliques et participent aux mécanismes de détoxification par l'immobilisation des métaux.

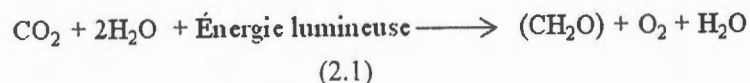
Une augmentation du nombre et du volume des granules d'amidon a été montrée chez *C. acidophila* lors du traitement au Cd de 20 μ M pendant 3 jours (Nishikawa *et al.*, 2003). Concernant d'autres articles, ils ont mentionné que, puisque les activités respiratoires ne

peuvent pas être réalisées sans mitochondries, la dégradation des mitochondries a conduit à l'accumulation d'amidon. En vérifiant l'effet de Cd sur le métabolisme de polyphosphate par ^{31}P -NMR, ils ont observé, malgré que le pic de polyphosphate ait disparu complètement, une forte augmentation dans le pic de phosphate vacuolaire après le stress au Cd, ce qui a suggéré que les deux processus sont liés. Les polyphosphates sont capables de se lier aux métaux, donc de protéger les cellules à l'action toxique des métaux. Les résultats de cette étude ont présenté l'hydrolyse des polyphosphates, la formation d'orthophosphates et la combinaison avec le Cd dans les vacuoles. Ils ont suggéré le rôle des vacuoles et la dégradation de polyphosphates dans la détoxification du Cd. Lavoie et ses collègues (2009) ont mentionné que les phosphates ont présenté une grande affinité pour les cations et les complexes de métal-phosphate formés avaient une faible solubilité. Donc, les polyphosphates pouvaient participer à la détoxification des métaux, mais la stabilité de ces complexes n'était pas bien connue. Le Cd présentait une faible affinité pour les phosphates et il pouvait être lié à d'autres ligands qui existaient dans les structures granulaires.

Le développement des organites membraneux a été trouvé chez *Chlamydomonas bullosa* comme une réponse au stress de Cd et de Cu. Il a été montré que 45,5% des cellules exposées à $0,025\ \mu\text{M}$ de Cd^{2+} et 60,6% des cellules exposées à $0,78\ \mu\text{M}$ de Cu^{2+} présentaient des organites membraneux par rapport au 21,1% des cellules de témoin (Visviki et Rachlin, 1994). Ces organites membraneux jouent un rôle important dans le mécanisme de détoxification. Leur grande surface permet de se lier aux métaux avec les groupes sulfhydriles empêchant la circulation des ions libres et l'interaction avec les sites internes vulnérables.

2.2 La photosynthèse

La photosynthèse est la seule source de stockage de l'énergie solaire sur la terre à la base de nos ressources énergétiques et alimentaires. Les plantes, les algues et les procaryotes utilisent directement l'énergie lumineuse par le processus de la photosynthèse pour la synthèse des matériaux organiques. En fait, la photosynthèse est une réaction d'oxydoréduction. L'équation de la photosynthèse oxygénique peut être présentée comme :



2.2.1 La cellule végétale et la photosynthèse

Au cours de la photosynthèse oxygénique, la photolyse de l'eau fournit les électrons pour la réduction du dioxyde de carbone (CO_2) et la synthèse des glucides. Pendant les années de 1950 et 1960, Daniel I. Arnon et ses collègues ont montré que les chloroplastes sont les organes responsables de la transformation du CO_2 en glucides grâce à la lumière. En conséquence, la photosynthèse comprend l'absorption de la lumière, la transformation de l'énergie, le transport d'électrons et les voies enzymatiques (Malkin et Niyogi, 2000). La photosynthèse se déroule dans un organite cellulaire appelé chloroplaste qui est entouré par une bicouche lipidique et aussi d'un système membranaire interne appelé thylacoïde. Les thylacoïdes sont des organites intracellulaires qui sont responsables de l'absorption de la lumière et du transport des électrons et des protons. Ils sont intégrés dans une matrice aqueuse appelée le *stroma*. Le caractère spécial des membranes de thylacoïde est la distinction des régions de *granum* et de *stroma*. En fait, un *granum* est constitué de 10 à 100 disques qui sont connus sous le nom de thylacoïde. La bicouche interne aqueuse du thylacoïde est appelée *lumen*. La Figure 2.13 montre la micrographie électronique d'un chloroplaste (Malkin et Niyogi, 2000 ; Mustárdy et Garab, 2003). Les processus photosynthétiques se divisent en deux phases : Durant la réaction lumineuse, l' O_2 , l'ATP (adénosine triphosphate) et le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) sont synthétisés; et au cours des réactions biochimiques liées au cycle de Calvin, l'ATP et le NADPH produits par la réaction lumineuse sont utilisés par un système enzymatique du *stroma* permettant la transformation du CO_2 en glucides qui est le produit final de la photosynthèse oxygénique. La Figure 2.14 montre les deux phases photosynthétiques qui se déroulent dans les différentes régions du chloroplaste.

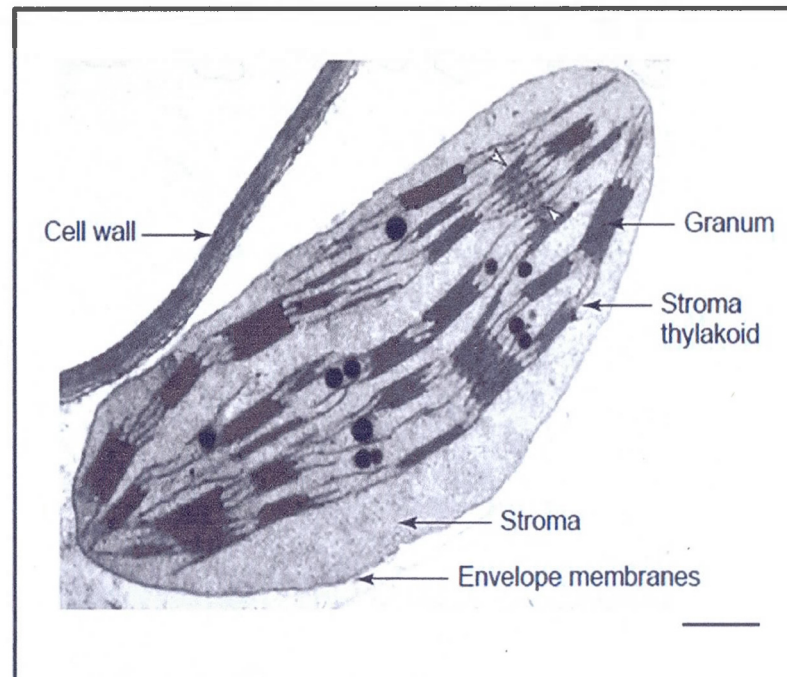


Figure 2.13 La micrographie électronique d'un chloroplaste par Staehelin, A. L. avec l'aimable permission de Andrew L. Staehelin et Richard Hallick. (<http://www.blc.arizona.edu/courses/181gh/rick/photosynthesis/chloroplasts.html>).

Dans la membrane du thylacoïde, on retrouve les complexes photosynthétiques, comme les photosystèmes I et II (PSI et PSII) qui sont responsables d'effectuer les réactions photochimiques. La chaîne de transport des électrons photosynthétiques comprend les centres réactionnels des PSII et PSI, le complexe cytochrome b_6f , les plastocyanines (PC) et les plastoquinones (PQ) où les électrons libérés par la photolyse de l'eau dans le *lumen* du thylacoïde peuvent se déplacer vers les composés actifs d'oxydoréduction tels que le NADP^+ dans le *stroma* (Malkin et Niyogi, 2000).

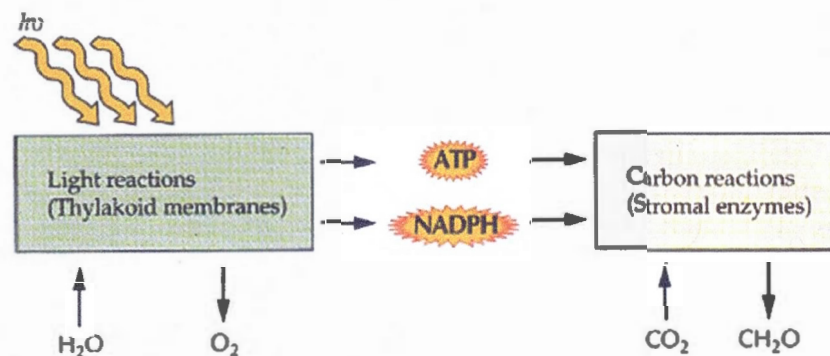


Figure 2.14 Les réactions lumineuses et biochimiques de la photosynthèse (d'après Malkin et Niyogi, 2000).

L'absorption d'un photon se fait par les molécules de pigment chlorophyllien de l'état stable à l'état excité. D'après les lois de mécanique quantique, pour faire la transition vers l'état excité, l'énergie doit correspondre à l'écart d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité (Malkin et Niyogi, 2000). Les chlorophylles et d'autres pigments tels que les caroténoïdes liés aux antennes collectrices de lumière du PSII absorbent l'énergie lumineuse.

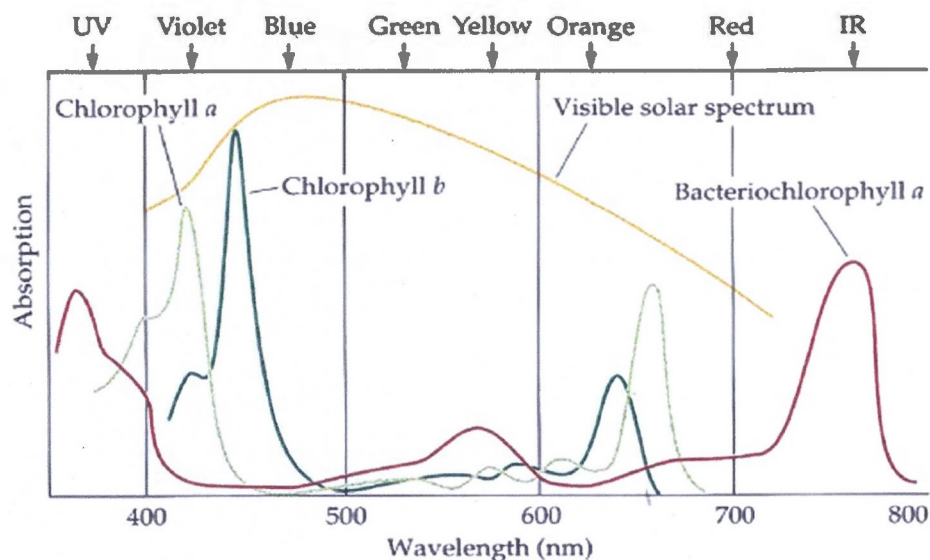


Figure 2.16 Les spectres d'absorption des molécules de la chlorophylle *a*, *b* et de la bactériochlorophylle *a* (d'après Malkin et Niyogi, 2000).

La chlorophylle possède deux maximums d'absorption très distincts, l'absorption d'un photon de lumière rouge et bleue, donc on observe deux niveaux d'énergie de l'état singulet excité (Figure 2.17). La lumière bleue possède une énergie plus élevée que la lumière rouge provoquant le passage de la chlorophylle à l'état excité supérieur. Au cours de l'absorption de la lumière par les pigments, ce sont les électrons π qui interagissent avec la lumière visible. En fait, les cycles de la chlorophylle possèdent les liaisons conjuguées et les électrons π sont impliqués dans des liaisons responsables de l'absorption de la lumière. L'énergie d'excitation est transférée par résonance d'une molécule de chlorophylle à une autre jusqu'à la paire spéciale de Chl *a* du centre réactionnel du PSII, appelé le P680, qui passera à un état excité P680* (Figure 2.18). Les passages internes ou les relaxations se déroulent lors du retour de la chlorophylle excitée à un niveau énergie plus faible que l'énergie d'excitation par la dissipation sous forme de chaleur ou sous forme de fluorescence (Farineau et Morot-Gaudry, 2006 ; Jupin et Lamant, 1999 ; Malkin et Niyogi, 2000).

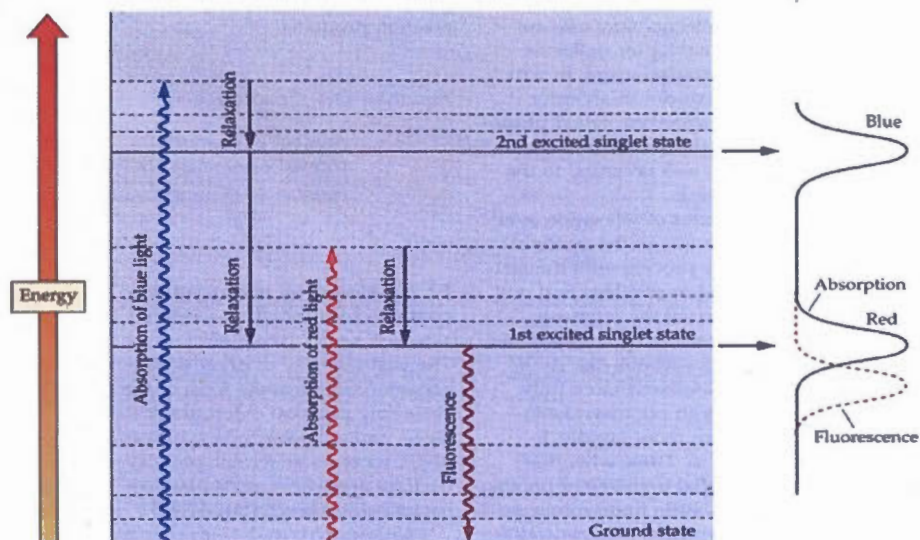


Figure 2.17 Les niveaux d'énergie dans la molécule de chlorophylle (d'après Malkin et Niyogi, 2000).

L'ensemble des centres réactionnels et des antennes associées fonctionnent comme une photopile biologique captant l'énergie lumineuse puis le transfert se fait à une dernière molécule de chlorophylle, qui à l'état excité fonctionne comme un réducteur pour un accepteur d'électron, et finalement la conversion de cette énergie est capturée en énergie chimique (Figure 2.19) (Brack et Mathis, 2000).

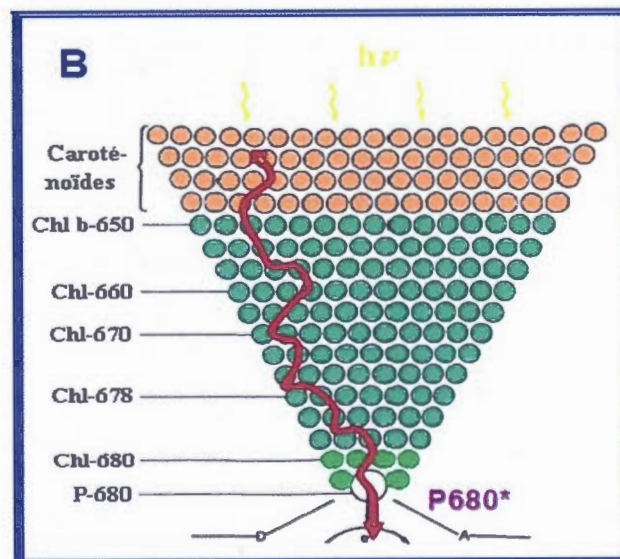


Figure 2.18 Schéma de l'organisation des pigments participant au transfert d'énergie dans le PSII (d'après Jupin et Lamant, 1999).

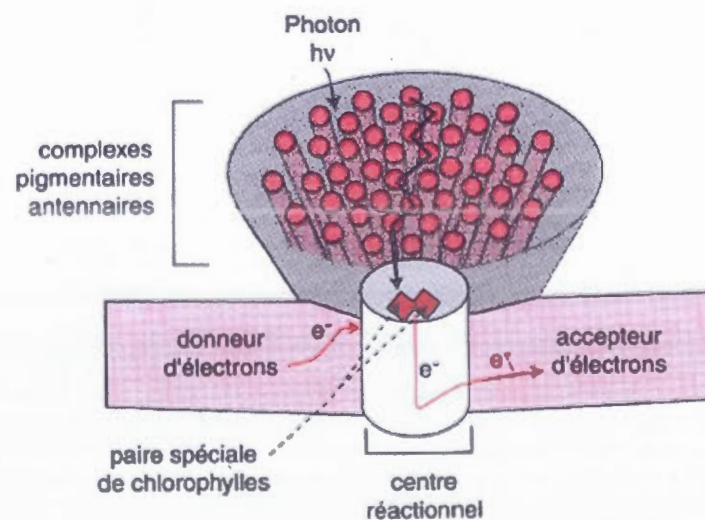


Figure 2.19 Fonctionnement d'une unité photosynthétique (d'après Brack et Mathis, 2000).

2.2.2 Le fonctionnement du photosystème

La photosynthèse oxygénique dépend de deux centres réactionnels, le PSII et le PSI, qui sont liés par le complexe cytochrome b_6f et les transporteurs d'électrons (Figure 2.20) (Whitmarsh et Govindjee, 1999).

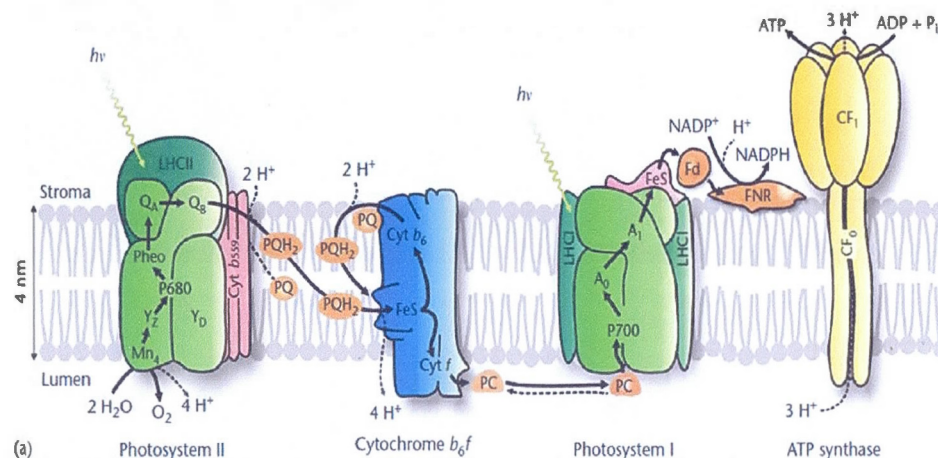
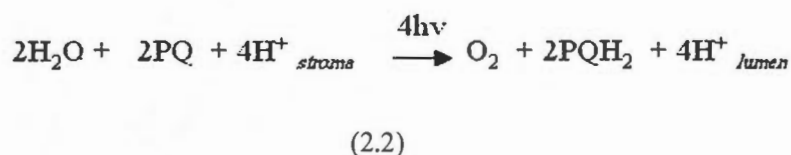


Figure 2.20 Disposition schématique des complexes protéiques et les cofacteurs impliqués dans le transport d'électrons et le transport de protons au cours de la photosynthèse dans les plantes supérieures. LHCI et LHCII, Complexe collecteur de lumière (*Light Harvesting Complexes*) du PSI et du PSII; Q_A et Q_B, Quinone A et B, accepteur primaire et secondaire d'électron du PSII; Pheo, Phéophytine; PQ, PQH₂, Plastoquinone à l'état oxydé et réduit; PC, Plastocyanine; Fd, Ferrédoxine; FNR, Ferrédoxine NADP-réductase; l'ATP synthétase avec les facteurs de couplage (CF₀ et CF₁). Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 1999).

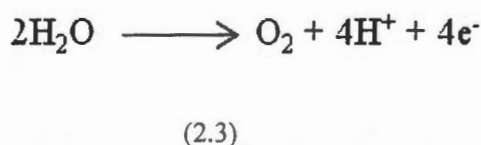
Le complexe cytochrome b_6f , le PSII et le PSI sont noyés dans la membrane photosynthétique. Les membranes photosynthétiques ou les thylacoïdes chez les plantes et les algues sont situés à l'intérieur des chloroplastes. La lumière est absorbée par les systèmes antennaires du PSII et PSI fournissant l'énergie pour le transport d'électrons à partir de l'eau en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺). En fait, le transport d'électrons entre le PSII et PSI fournit l'énergie pour la formation du gradient de protons à travers la

membrane, puis le gradient de protons va être utilisé par l'ATP synthétase pour produire de l'ATP. L'ATP et le NADPH produits par la réaction lumineuse à la suite du transport d'électrons fournissent l'énergie nécessaire pour la transformation du CO₂ en glucides (Govindjee *et al.*, 2010).

Le PSII utilise la lumière visible (400 – 700 nm) pour réaliser la réaction globale ci-dessous :



Cette réaction chimique possède deux étapes: la photooxydation de l'eau et la réduction de la plastoquinone conduisant un gradient de protons à travers la membrane des thylacoïdes. La photooxydation de l'eau (équation 2.3) est la somme de quatre réactions individuelles au cours desquelles deux molécules d'eau sont fractionnées pour obtenir une molécule d'O₂ et quatre protons sont libérés dans la phase aqueuse interne de la membrane photosynthétique (*lumen*) contribuant à la formation du gradient de protons utilisé pour la formation d'ATP. Quatre électrons extraits sont utilisés pour le transport d'électrons *via* le PSII et PSI (Govindjee *et al.*, 2010 ; Lubitz, Reijerse et Messinger, 2008).



Le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) participe dans la photolyse de l'eau. Il est composé de trois protéines extrinsèques à côté du lumen PsbO (33 kDa), PsbQ (17 kDa) et PsbP (23 kDa) (Rivas, Balsera et Barber, 2004). Le *cluster* de Mn₄O_xCa (x ≥ 4) est le cœur de ce complexe, qui est situé dans le lumen à côté de la protéine D1, possédant un ligand de la protéine CP43. En fait, le *cluster* de Mn₄O_xCa est entouré par les protéines D1 et D2, les extensions des protéines de l'antenne interne CP43 et CP47 et plusieurs polypeptides extrinsèques qui stabilisent et optimisent le complexe de la photolyse de l'eau et son activité.

Le *cluster* de Mn_4O_xCa est impliqué dans l'extraction des électrons de l'eau (Figure 2.21) (Govindjee *et al.*, 2010).

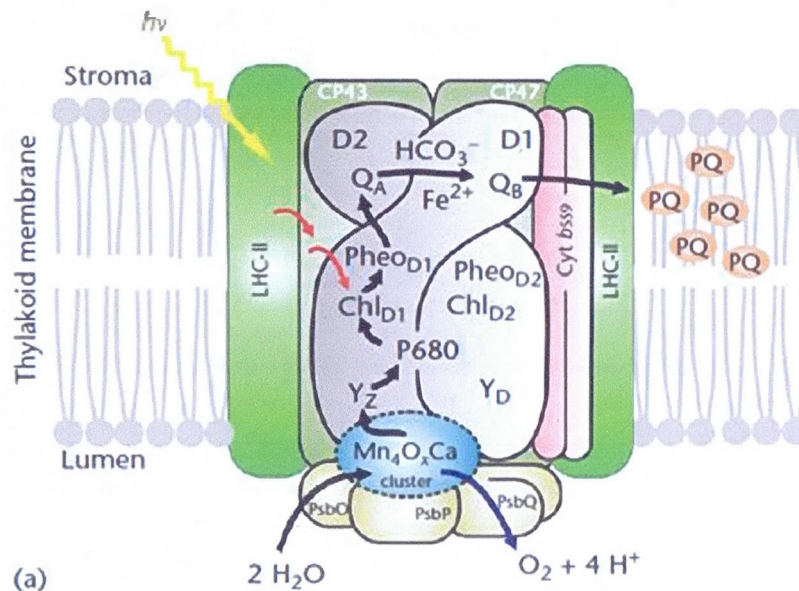
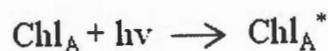


Figure 2.21 Modèle structurel des composés du centre réactionnel du PSII chez les plantes supérieures et les algues. D1 et D2, protéines dominantes du PSII; CP43 et CP47, protéines de l'antenne interne; cyt *b559*, cytochrome *b559*; Q_A , quinone *a*; Q_B , quinone *b*; Mn_4O_xCa , tétramère (*cluster*) de manganèse d'oxygène de calcium où $x \geq 4$, impliqué dans l'extraction des électrons de l'eau; P680, la paire spéciale de chlorophylles (P_{D1} et P_{D2}) du PSII; Chl_{D1} , le donneur primaire d'électron; $Pheo_{D1}$, la phéophytine sur D1 qui est l'accepteur primaire d'électron; Y_Z (sur D1) et Y_D (sur D2) sont les résidus tyrosine redox active; PQ, Plastoquinone mobile dans la membrane; LHC-II, Complexe collecteur de lumière du PSII; PsbO (33 kDa), PsbQ (16 kDa) et PsbP (23 kDa) sont des protéines extrinsèque qui stabilisent et optimisent le complexe de la photolyse de l'eau et son activité. Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Govindjee *et al.*, 2010).

Il existe quatre processus participant dans la réalisation des réactions du PSII (Lubitz, Reijerse et Messinger, 2008). La première étape est l'absorption de la lumière et le transfert

d'énergie qui est réalisée par les molécules de pigments (chlorophylle, caroténoïde) des complexes antennaires (équation 2.4):



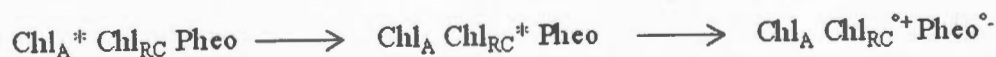
(2.4)

L'antenne interne du complexe antennaire est associée au centre réactionnel du PSII (Figure 2.21). Elle est constituée de deux protéines, CP43 et CP47 (poids moléculaire de 32 et 34 kDa, respectivement). L'excitation (ou exciton) est transférée au hasard, d'un pigment à l'état excité à un autre à l'état fondamental (Barter, Klug et Van Grondelle, 2005) (équation 2.5) jusqu'à la paire spéciale de chlorophylle du centre réactionnelle du PSII (P680).



(2.5)

La première séparation de charge et la stabilisation se déroule dans le centre réactionnel (RC) qui est organisé par quatre molécules de chlorophylle et deux molécules de phéophytine. En fait, la séparation de charge va initier le transport d'électrons vers l'accepteur primaire d'électrons (phéo). Deux protéines majeures du PSII sont D1 et D2. Les composants du transport d'électrons (chlorophylle et phéophytine) se lient par D1 et D2 (Figure 2.21). L'ensemble de ces processus est montré par l'équation 2.6 (Renger et Holzwarth, 2005) :

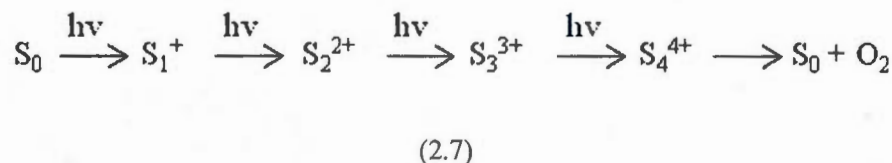


(2.6)

Le radical cation de $\text{Chl}_{\text{RC}}^{\bullet+}$ est aussi connu comme $\text{P680}^{\bullet+}$ à cause de l'absorption maximale de la Chl_{RC} à une longueur d'onde de 680 nm (Govindjee et Coleman, 1990), et

pour cette raison le centre réactionnel du PSII est souvent appelé P680. En conséquence, un électron de la Chl_{RC}^* (ou P680^*) sera transféré vers la Phéo et la Chl_{RC} ou P680 qui aura l'état oxydé ($\text{Chl}_{\text{RC}}^{\circ+}$ ou $\text{P680}^{\circ+}$). Le transfert d'électrons de la Phéo à la molécule de la plastoquinone (PQ) liée au site Q_A et la réduction de $\text{P680}^{\circ+}$ par Y_Z qui est le résidu tyrosine redox active de la protéine D1 vont stabiliser la première séparation de charge. Le Y_Z oxydé ou Y_Z° va ensuite oxyder le *cluster* de $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$. Tous les deux sont des composants du complexe de dégagement d'oxygène et le *cluster* de $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$ est le cœur de ce complexe. Après quatre oxydations successives du *cluster* de $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$ par Y_Z° , deux molécules de l'eau fractionnées conduisent à la formation d'une molécule d'oxygène.

Le modèle des états « S » permet de mieux comprendre comment la photooxydation de l'eau induit la réaction photochimique (Kok, Forbush et McGloin, 1970). Ils ont suggéré que la libération d' O_2 a besoin de quatre transferts d'électrons que chaque transfert d'électron du complexe de dégagement d'oxygène permet le passage d'un état "S" à un autre tel qu'il est montré par l'équation 2.7 :



En fait, Le rendement de formation d'oxygène pendant la photooxydation de l'eau passe par un cycle de 5 étapes et le cycle est avancé séquentiellement par les photons capturés par le PSII jusqu'à l'état fortement oxydé ou S_4 (Figure 2.22). La photooxydation de l'eau se déroule à l'état S_4 , ce qui entraîne l'émission d'une molécule d' O_2 et le retour à l'état S_1 .

L'électron capté par la phéophytine est ensuite transféré par une chaîne de transport composant les quinones (Q_A et Q_B), les plastoquinones (PQ), le cytochrome b_6f et les plastocyanines (PC). Q_A est une molécule PQ fermement liée tandis que Q_B est une molécule PQ mobile, l'électron de Q_A est transféré à une autre molécule de plastoquinone liée au site Q_B . Après deux mouvements photochimiques, Q_B devient complètement réduit et les deux charges négatives de la PQ sont neutralisées par deux protons en provenance du *stroma* formant PQH_2 . Les molécules de plastoquinones réduisent les cytochromes b_6f et libèrent

deux protons dans le *lumen* du thylacoïde, ce qui contribue à la formation du gradient transmembranaire de protons nécessaire pour la synthèse de l'ATP. Ensuite, une nouvelle molécule de PQ se lie au site Q_B dans la membrane de thylacoïdes. Les étapes mentionnées sont montrées par les équations ci-dessous (Lubitz, Reijerse et Messinger, 2008) :

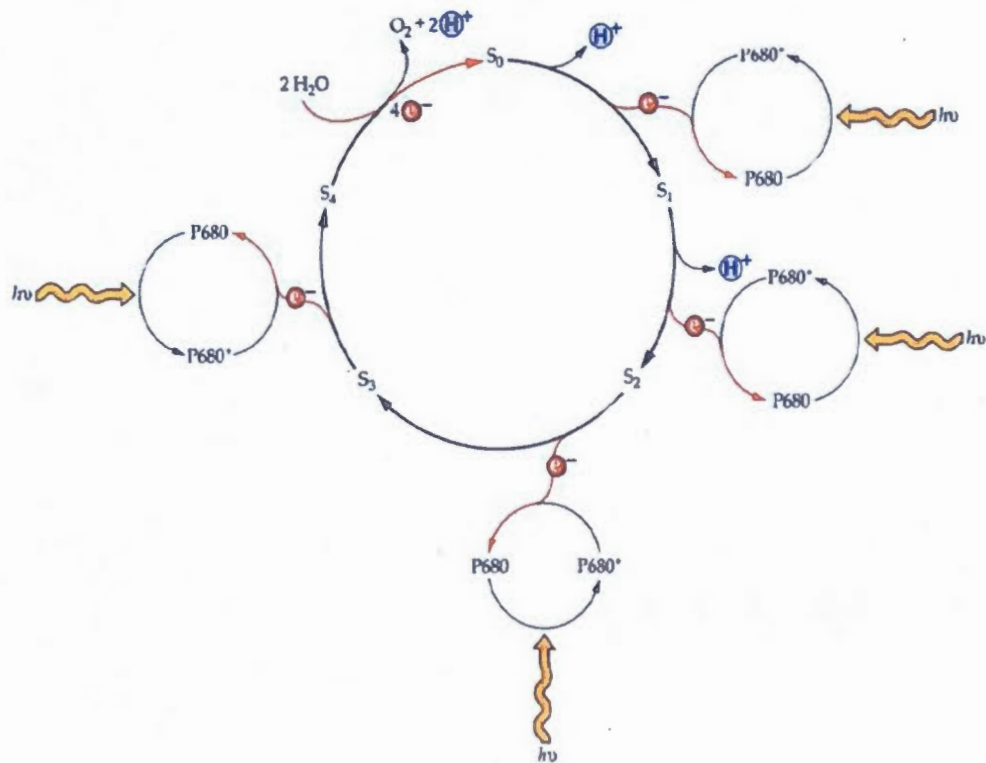
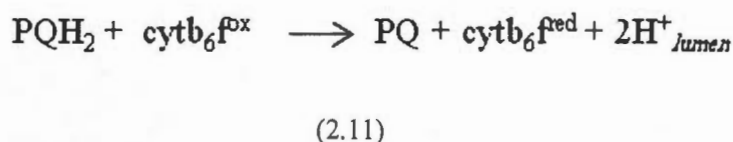
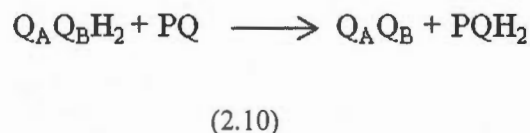
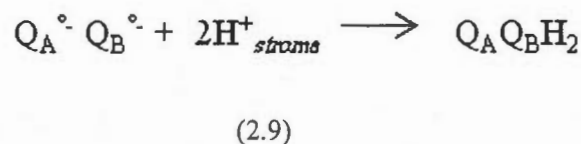


Figure 2.22 Schéma de la formation des états S et la production de protons pendant la photooxydation de l'eau conduisant au dégagement d' O_2 (Buchanan, Gruissem et Jones, 2000).



(2.8)



Les réactions (2.8 – 2.10) constituent la barrière à deux électrons qui stabilise la séparation de charge et les électrons sont transportés à partir du PSII par une chaîne de transport linéaire des électrons photosynthétiques conduisant à la réduction du dioxyde de carbone (CO₂) et la synthèse des glucides. Les cytochromes b₆f transfèrent les électrons à la plastocyanine, puis au P700⁺ du PSI. Le fer non hémique entre Q_A et Q_B représente plus un rôle structural, mais il peut se lier à un ion bicarbonate en impliquant dans l'ajout deux protons à Q_B²⁻.

L'efficacité de la réaction photochimique du PSII dépend de la recombinaison de la première séparation de charge ou dépend de la stabilisation de la séparation de charge qui se fait par le transport rapide (dans la plage de 200 ps) des électrons à partir de la phéophytine à la molécule de plastoquinone (PQ) liée au site Q_A. Le transport linéaire d'électrons entre PSII et PSI peut être présenté comme un schéma en Z en considérant les différences dans le potentiel redox des transporteurs d'électrons associés au PSII et PSI (Figure 2.21 et 2.23) (Whitmarsh et Govindjee, 1999).

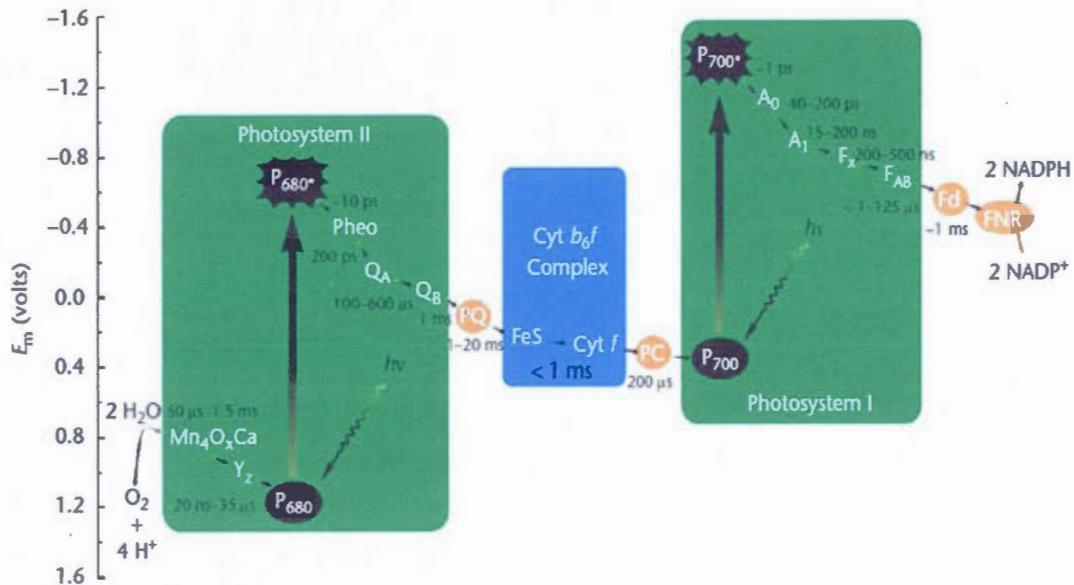


Figure 2.23 Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétiques en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. La durée approximative du transfert d'électrons est indiquée pour plusieurs réactions. $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$, tétramère (*cluster*) de manganèse d'oxygène et de calcium où $x \geq 4$; Yz, tyrosine-161 sur la protéine D1; P680, le premier donneur d'électron du PSII; P680^* , l'état excité du P680; Pheo, la phéophytine; Q_A , plastoquinone liée; Q_B , plastoquinone liée et non liée au PSII; PQ, le *pool* de plastoquinones. La boîte centrale (en bleu) représente un complexe de protéines contenus deux molécules cytochromes b_6f et une protéine fer-soufre (FeS) et un cytochrome f (Cyt f); PC, plastocyanine; P700, le centre réactionnel du PSI; P700^* , l'état excité de P700; A_0 , une molécule spéciale de chlorophylle *a*; A_1 , F_x , $\text{F}_\text{A}/\text{F}_\text{B}$ et F_d sont les accepteurs d'électrons du PSI; F_d , férredoxine; FNR, férredoxine NADP-réductase; NADP^+ , nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 1999).

2.2.3 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II

La lumière est absorbée par la chlorophylle et les caroténoïdes qui sont liés aux complexes collecteurs de lumière (LHC-protéines) dans la membrane du thylacoïde. En fait, la molécule de chlorophylle passe à l'état singulet excité ($^1\text{Chl}^*$) et pour retourner à un niveau d'énergie plus faible, l'énergie d'excitation peut être dissipée par la voie photochimique, c'est-à-dire l'énergie d'excitation peut être transférée vers les centres réactionnels entraînant le transport des électrons. Cela conduit à l'oxydation de l'eau, à la réduction du NADP^+ et finalement à l'utilisation de l'énergie produite pour la synthèse de l'ATP. D'autres voies de dissipation de l'énergie d'excitation peuvent être sous forme non-photochimique (NPQ) ou de chaleur, et aussi sous forme de fluorescence par l'état triplet excité ($^3\text{Chl}^*$). L'état triplet excité ($^3\text{Chl}^*$) peut transférer l'énergie à l'état fondamental de l' O_2 formant l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2^*$), l'une des espèces réactives de l'oxygène extrêmement nuisibles (Figure 2.24). La dissipation de l'énergie d'excitation par la voie non-photochimique peut faire diminuer la fluorescence chlorophyllienne, appelée NPQ ou qN (*quenching* non photochimique) (Müller, Li et Niyogi, 2001). En fait, le phénomène de *quenching* correspond à une diminution de la fluorescence qui peut être lié à la dissipation d'énergie *via* la réaction photochimique et les réactions non photochimiques (sous forme de chaleur) (Schreiber, 2004).

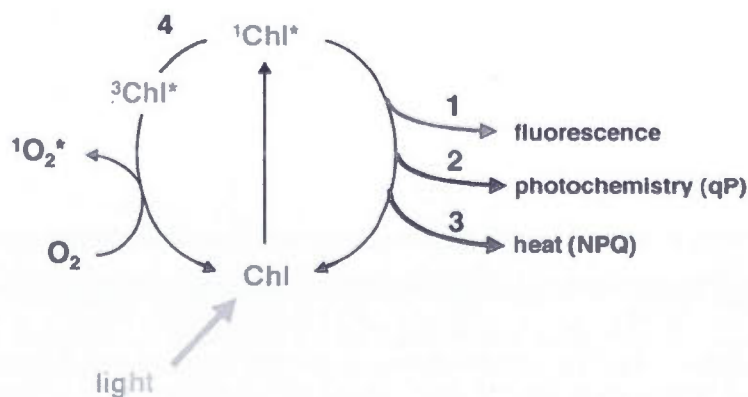


Figure 2.24 Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (d'après Müller, Li et Niyogi, 2001).

Strasser et Strasser (Figure 2.25) ont développé (1995) un modèle simple représentant les flux d'énergie dans l'appareil photosynthétique qui est basé sur la théorie des flux d'énergie de Strasser (1978, 1981) (Force, Critchley et van Rensen, 2003 ; Strasser et Strasser, 1995).

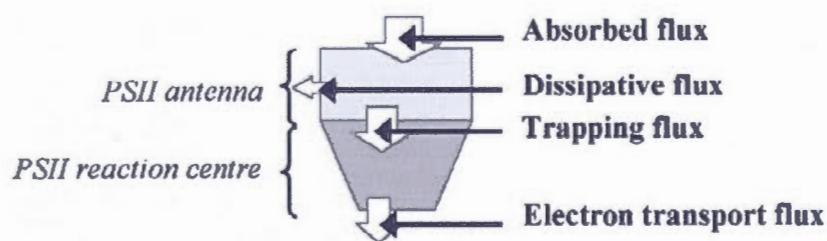


Figure 2.25 Modèle simple des flux d'énergie dans l'appareil photosynthétique présenté par Strasser et Strasser (1995), basé sur la théorie des flux d'énergie de Strasser (1978, 1981). Les flux d'énergie peuvent être considérés comme un flux absorbé (ABS), un flux d'énergie piégée par le centre réactionnel du PSII (TR), utilisant pour faire la séparation de charge, un flux d'énergie engagé dans le transport d'électrons (ET), un flux d'énergie dissipé sous forme de chaleur ou de fluorescence (DI).

Les voies principales des flux d'énergie liées à la fluorescence chlorophyllienne (Chl *a*) ont été présentées par Stribet et Govindjee (2011) (Figure 2.26). J^{ABS} représente le taux d'absorption des photons par les pigments antennaires du PSII, J^{DI} est le flux d'énergie dissipé sous forme de chaleur ou de fluorescence, J^{TR} représente le taux de l'énergie piégée par le centre réactionnel du PSII formant $P680^+$ et $pheQ_A^-$, et J^{ET} est le taux du transport d'électrons à partir de la molécule de l'eau à Fd et $NADP^+$.

Un modèle simple pour la photochimie du photosystème II a été présenté par Butler (1978) (Figure 2.27). Comme ce modèle montre clairement, l'énergie lumineuse absorbée par les chlorophylles associées au PSII peut être utilisée pour réaliser la réaction photochimique par laquelle un électron (e^-) est transféré à partir du centre réactionnel du PSII, P680, à l'accepteur primaire d'électron qui est la quinone A (Q_A). Autrement, l'énergie d'excitation peut être dissipée sous forme de fluorescence chlorophyllienne ou sous forme de chaleur.

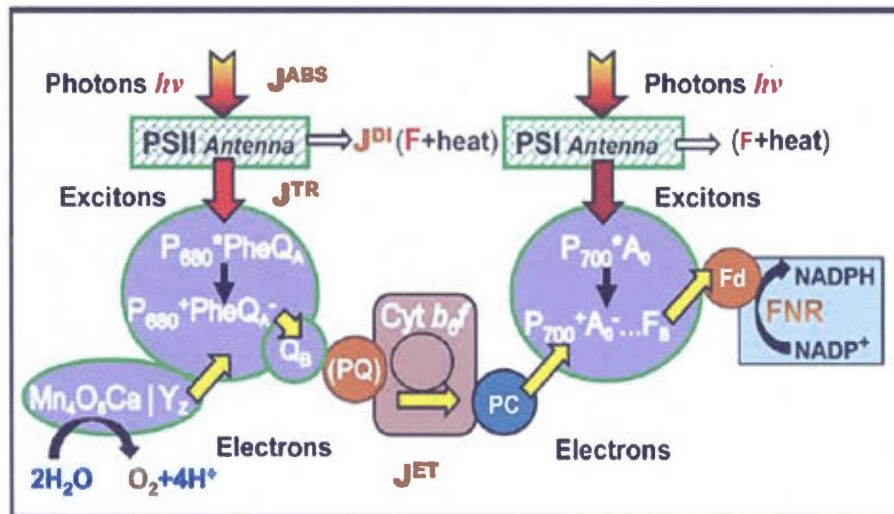


Figure 2.26 Représentation schématique des principales voies de flux d'énergie liées à la fluorescence chlorophyllienne (Chl *a*). Comme l'origine de la fluorescence chlorophyllienne vient des systèmes antennaires du PSII, J^{ABS} est inséré dans la partie concernant le PSII (Stirbet et Govindjee, 2011).

C'est-à-dire que la photochimie du photosystème II fait concurrence avec les processus de fluorescence et la perte de chaleur, de sorte que la diminution du transfert d'énergie par la voie photochimique va augmenter la dissipation *via* la fluorescence et la chaleur (Baker, 2008).

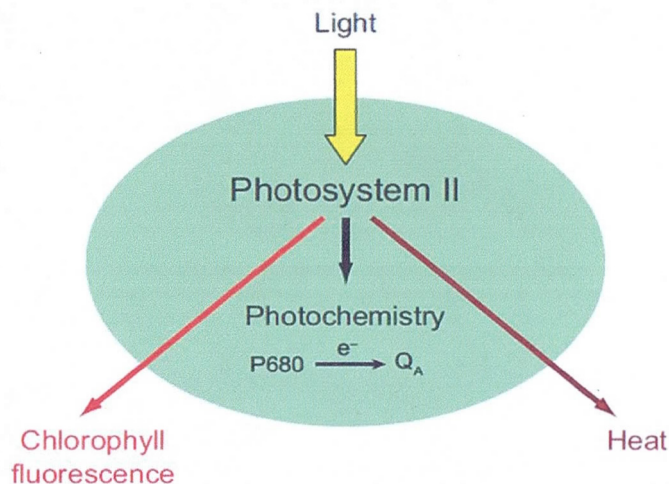


Figure 2.27 Les voies de dissipation d'énergie du photosystème II (modèle présenté par Butler, 1978).

2.2.4 Induction de la fluorescence

L'induction de la fluorescence chlorophyllienne (Chl *a*) (FI) est une méthode très sensible, rapide, non invasive et facile à mesurer avec des équipements moins coûteux donnant des informations importantes concernant le fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Lazár, 1999 ; Papageorgiou et Govindjee, 2004). L'induction de la fluorescence chlorophyllienne a été découverte par Kautsky et Hirsh en 1931. Ils ont découvert que les plantes sous une illumination continue émettaient de la fluorescence de sorte que l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne montraient des changements caractéristiques en fonction du temps. La mesure de la cinétique de la fluorescence variable est appelée l'induction de la fluorescence chlorophyllienne (FI) ou *effet Kautsky*. Deux étapes sont observées dans l'induction de la fluorescence, l'augmentation rapide (1 sec) de l'intensité de la fluorescence à partir d'un niveau faible initial (F_0) à un niveau d'intensité maximale (F_p ou F_M) sous une lumière saturante et après quelques minutes une diminution lente de l'intensité de la fluorescence (F_s ou F_t). Le phénomène de *quenching* correspond à une diminution de la fluorescence. Donc, l'augmentation rapide de l'intensité de la fluorescence correspond à la conversion de l'état éteint (*quenched*) à l'état non éteint (*unquenched*) du PSII. L'état éteint est appelé ouvert, c'est-à-dire que le centre réactionnel du

PSII est capable de faire la séparation de charge avec une grande capacité, tandis que l'état non éteint est appelé fermé et se déroule lorsque le centre réactionnel du PSII n'est pas capable de faire la réaction photochimique (Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). L'émission de la fluorescence chlorophyllienne est issue de la chlorophylle *a* des antennes collectrices de la lumière du PSII et de la Chl *b* qui joue un rôle accessoire transférant l'énergie d'excitation à la Chl *a* (Lazár, 1999).

La lumière est absorbée et la chlorophylle passe de l'état stable à l'état excité. Pour retourner à un niveau d'énergie plus faible, l'énergie d'excitation peut être dissipée *via* la voie photochimique, sous forme de chaleur ou bien sous forme de fluorescence. La Figure 2.28 (a) (Govindjee *et al.*, 2010) montre que, quand le centre réactionnel est ouvert, l'énergie est utilisée pour la séparation de charge et l'émission de la fluorescence chlorophyllienne est minimale. En fait, la fluorescence minimale est nommée la fluorescence de base (F_0) lorsque Q_A est oxydée. Lorsque le centre réactionnel est fermé (Figure 2.28 (b)), l'émission de la fluorescence chlorophyllienne est maximale et est nommée la fluorescence maximale (F_M) lorsque Q_A est complètement réduite (Lazár, 2006 ; Strasser et Stirbet, 2001 ; Vredenberg, 2000). Il faut ajouter que F_0 représente le signal de fluorescence provenant des chlorophylles excitées avant d'atteindre l'énergie d'excitation au centre réactionnel du PSII (Mathis et Paillotin, 1981).

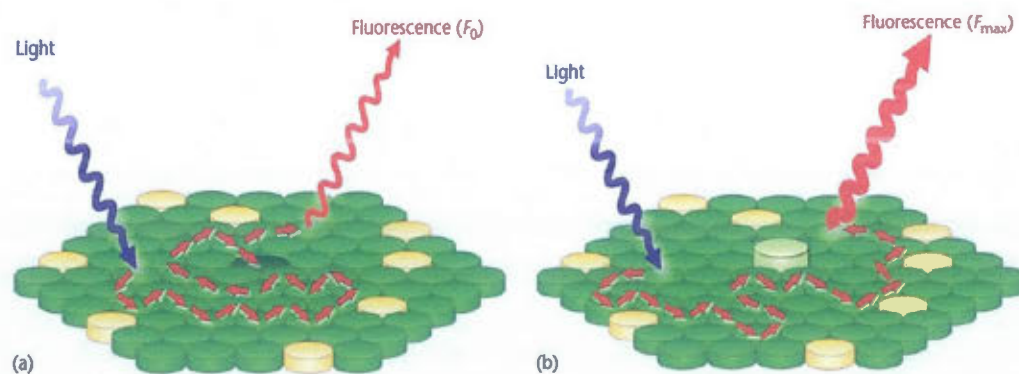


Figure 2.28 Les antennes collectrices de la lumière avec les centres réactionnels fermés et ouverts. Petites flèches rouges montrent le transfert d'énergie d'excitation à partir d'une molécule de chlorophylle à l'autre; disques verts, Chl *a* et *b*; disques jaunes, les caroténoïdes;

disque vert foncé au milieu du panneau (a), centre réactionnel ouvert; disque vert clair au milieu du panneau (b), centre réactionnel fermé. Cette Figure a été dessinée par Dmitriy Shevela (dans le laboratoire de J.M.) (d'après Govindjee *et al.*, 2010).

2.2.5 Principe de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne

Strasser, Srivastava et Govindjee (1995) ont montré pour la première fois qu'il existe différentes étapes dans la courbe de croissance de l'induction rapide de la fluorescence chlorophyllienne entre le niveau initial (F_0) et le niveau maximal (F_p ou F_M) de sorte que cette cinétique rapide et polyphasique de fluorescence correspond à l'activité du transport d'électrons du PSII et de la photolyse de l'eau. Ils ont choisi les symboles O-J-I-P pour identifier ces étapes en présentant la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne sur une échelle de temps logarithmique. En fait, les transitions O-J-I-P montrent les différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons du PSII (Figure 2.29). En fait, l'induction de la fluorescence chlorophyllienne est commencée à l'état initial de fluorescence (F_0) et elle atteint l'état maximal (F_p) en passant par deux étapes intermédiaires (F_J et F_I). La transition O-J représente la réduction de l'accepteur primaire d'électrons, Q_A (Neubauer et Schreiber, 1987 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). L'émission de fluorescence à la transition I montre la première réduction de Q_B (Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995), la transition I-P représente une accumulation de Q_B complètement réduit ($Q_A^- Q_B^{2-}$) et le niveau maximal de fluorescence est atteint quand les PQ sont complètement réduites (Neubauer et Schreiber, 1987 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). Selon les conditions expérimentales, une diminution de l'intensité de fluorescence (*dip*) peut être observée après chaque étape (Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995).

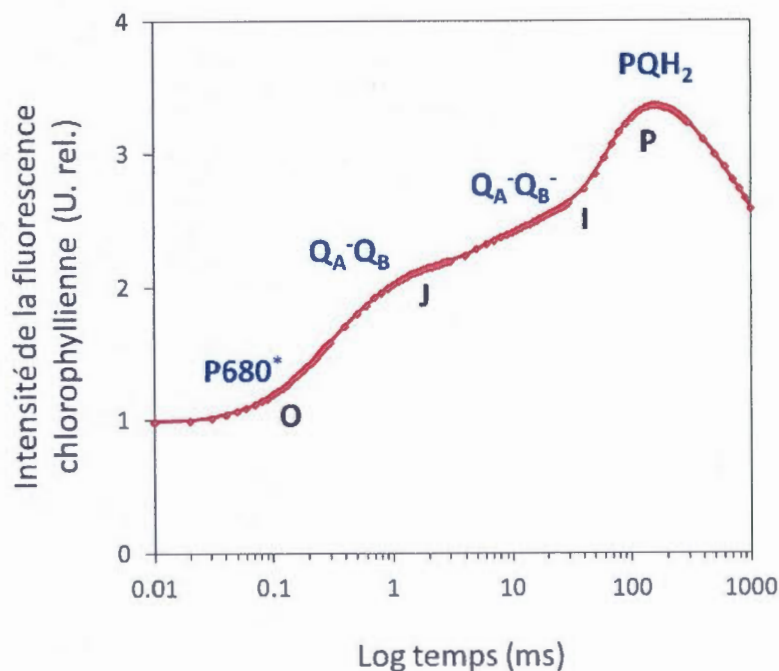


Figure 2.29 Courbe d'induction de fluorescence représentant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique; Q_A , accepteur primaire; Q_B , accepteur secondaire; PQH_2 , Plastoquinone à l'état réduite; $P680^*$, Centre réactionnel du PSII à l'état excité (d'après Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995).

L'induction de la fluorescence chlorophyllienne peut être utilisée comme un outil sensible pour l'analyse *in vivo* de l'appareil photosynthétique sous les conditions physiologiques. L'acquisition de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne permet d'estimer différents paramètres de fluorescence connus comme indicateurs de l'efficacité photochimique du PSII. Selon le temps de l'apparition de chaque étape à la Figure 2.29, ces paramètres vont être déterminés à 20 μ sec ($F_O = F_{20\mu sec}$), 2 msec ($F_J = F_{2msec}$), 30 msec ($F_I = F_{30msec}$). La fluorescence maximale est atteinte (F_M) à la transition P sous une lumière saturante. Dans notre travail les paramètres ci-dessous ont été utilisés :

- Le rendement de la réaction photochimique primaire du PSII :

$$\Phi_{PO} = (F_M - F_{20\mu sec}) / F_M = F_V / F_M \quad (\text{Strasser, Tsimilli-Michael et Srivastava, 2004})$$

Où $F_{20\mu\text{sec}}$ représente le niveau de fluorescence de base à 20 μsec à la transition O lorsque le centre réactionnel du PSII est complètement ouvert et F_M est le niveau de fluorescence maximal à la transition P lorsque le centre réactionnel du PSII est complètement fermé qui indique la réduction maximale du PSII. F_v représente la fluorescence variable maximale.

- Le paramètre ABS/RC qui permet une estimation de la proportion des antennes collectrices du centre réactionnel (RC) du PSII et donc une estimation de l'absorption de l'énergie lumineuse (ABS) :

$$\text{ABS/RC} = ([M_o/V_J] / [F_v/F_M]) \text{ (Force, Critchley et van Rensen, 2003)}$$

Où M_o indique la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable dépendant du centre réactionnel du PSII selon l'équation $M_o = (4 [F_{300\mu\text{s}} - F_{20\mu\text{s}}] / [F_M - F_{20\mu\text{s}}])$ où $F_{300\mu\text{s}}$ représente le niveau de fluorescence à 300 μsec et le paramètre V_J indique la fluorescence variable relative à la réduction de Q_A selon l'équation $V_J = ([F_{2\text{ms}} - F_{20\mu\text{s}}] / [F_M - F_{20\mu\text{s}}])$ où $F_{2\text{ms}}$ représente le niveau de fluorescence à 2 msec à la transition J. En fait, le ratio M_o/V_J représente le taux piégé maximal selon lequel une paire d'électron-trou est piégé par le centre réactionnel.

- L'indice de performance du PSII qui est obtenu en multipliant trois paramètres :

$$\text{PI}_{\text{ABC}} = (1 - [F_{20\mu\text{s}} - F_M / M_o / V_J]) (F_M - F_o / F_o) (1 - V_J / V_J) \text{ (Strasser, Tsimilli-Michael et Srivastava, 2004)}.$$

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Le matériel et les équipements analytiques

3.1.1 Liste du matériel utilisé

- *Chlamydomonas reinhardtii*, le phénotype sauvage (CC-125, Duke University, Durham, NC).
- *Chlamydomonas acidophila*, la souche CPCC-121 (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada).
- Milieu de culture HSM préparé au laboratoire (Harris, 1989).
- Milieu de culture MAM préparé au laboratoire (Olaveson et Stokes, 1989).
- Acide nitrique 72%.
- EDTA.
- Peroxyde d'hydrogène 30% (*Caledon laboratory chemicals*).
- Sel de CdCl_2 (*Anachemia*).
- Diacétate de fluorescéine (FDA, *Invitrogen Molecular Probe, Eugene, OR*).
- Eau nanopure (*Thermo Scientific Barnstead Nanopure ultrapure water purification system*).
- Acetone 100%.

- Méthanol 100%.
- Papier filtre en nitrate de cellulose (Millipore 0.45 μm).
- Papier filtre de fibre de verre millipore (Millipore No. AP2001300).
- Seringues de 50 ml et 25 ml.

3.1.2 Les appareils

- Compteur de cellules, Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA).
- Spectrométrie UV-Vis (Lambda 40, Perkin-Elmer, Woodbridge, Canada).
- Spectrométrie d'absorption atomique (FAAS, Varian spectrAA 220 FS).
- Cytomètre en flux (FacScan; Becton Dickinson instrument).
- Handy-PEA, Hansatech Ltd., Norfolk, UK.
- Agitateur.
- Centrifugeuse.

3.1.3 Les logiciels

- Logiciel Visual MINTEQ 2.61(KTH, Department of Land and Water Resources Engineering, Stockholm, Sweden).
- Logiciel WinMDI 2.8.
- Logiciel Microsoft Office Excel 2007.

3.2 Les approches méthodologiques

3.2.1 Les cultures d'algues

Les algues vertes *Clamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas acidophila* ont été cultivées dans un litre de milieu de culture HSM (Harris, 1989), et aussi de MAM (Olaveson

et Stokes, 1989) seulement pour la croissance de *C. acidophila* à pH 4 sous un régime de lumière continue obtenu par des lampes fluorescentes blanches à une intensité de $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvania GroLux F 36 W, Drummondville, Canada) et sous une aération permettant d'obtenir une concentration constante de CO_2 et une température de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. La densité cellulaire en phase exponentielle des algues dans chaque milieu a été déterminée par le Multisizer Z3 et par la mesure de l'absorbance à l'aide de la spectrométrie UV-Vis à longueur d'onde de 750 nm.

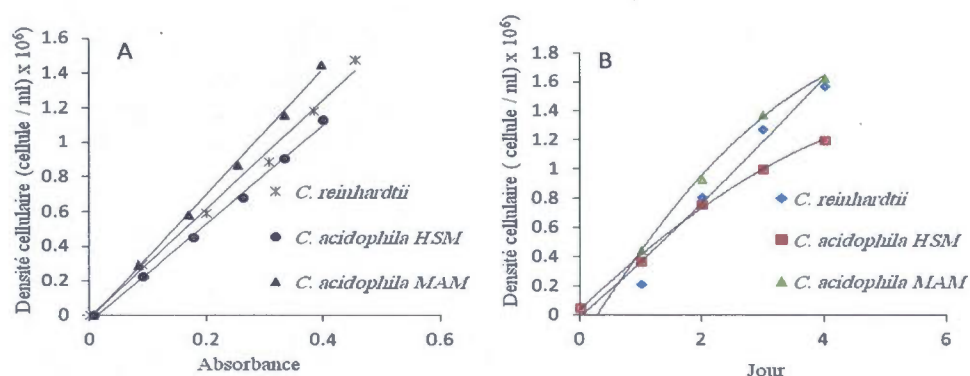


Figure 3.1 La courbe d'étalon (A) et la courbe de croissance (B) des cultures d'algues *C. reinhardtii* et *C. acidophila* dans le milieu HSM et MAM.

La courbe d'étalon représentant la densité cellulaire en fonction de l'absorbance est montrée pour chaque culture dans la Figure 3.1 A. L'équation linéaire obtenue pour *C. reinhardtii* et *C. acidophila* dans le milieu HSM est respectivement $y = 3 \times 10^6 x - 15965$, et $y = 3 \times 10^6 x - 40384$ et pour *C. acidophila* dans le milieu MAM, $y = 4 \times 10^6 x - 31833$, où y représente la densité cellulaire et x représente l'absorbance. La courbe de croissance représentant la densité cellulaire en fonction du jour a été obtenue pendant 4 jours de croissance des algues (Figure 3.1 B). La densité initiale obtenue pour toutes les algues dans tous les milieux de culture était de 500000 cellules/mL.

3.2.2 Traitement au cadmium

La solution mère (600 mM) a été préparée avec le CdCl_2 dissous dans l'eau nanopure. Les algues en phase exponentielle (500000 de cellules / mL) ont été exposées aux différentes

concentrations de Cd entre 50 et 600 μM . Le volume final d'exposition des algues a été de 20 mL et les échantillons ont été préparés à l'aide des milieux de cultures HSM et MAM. Pendant 72 h d'exposition au Cd, des mesures ont été effectuées concernant le changement de la densité, de la taille et de la granulosité cellulaire, de l'accumulation intracellulaire et de l'activité des enzymes estérases. Pendant 24 h d'exposition au Cd, la mesure de la fluorescence chlorophyllienne a été faite. Les algues exposées ont été mises sur l'agitateur avec une vitesse constante de 100 rpm. Le calcul d'équilibre chimique en utilisant le logiciel Visual MINTEQ 2.61 a permis de déterminer la proportion en ion libre de Cd dans chaque milieu de culture. Les concentrations nominales de Cd et les concentrations totales des constituants des milieux de culture ont été utilisées comme les données d'entrées. Les ions libres de Cd aux concentrations de 6,173, 12,383, 24,887, 50,212 et 75,954 μM correspondent respectivement aux concentrations totales de Cd de 50, 100, 200, 400 et 600 μM dans le milieu HSM et ces valeurs pour les ions libres de Cd sont égales aux concentrations de 16,572, 50,629, 118,640, 252,940 et 384,870 μM dans le milieu MAM. En fait, l'effet toxique des métaux est lié directement aux ions métalliques libres par rapport à la concentration totale du métal (Gimmler *et al.*, 1991), et Nishikawa et Tominaga (2001) ont mentionné que le pH joue un rôle très important pour la spéciation et la disponibilité des métaux pour les organismes vivants. Le tableau 3.1 montrent les formes de Cd qui sont en contact avec des cellules dans chaque milieu de culture. La détermination de la spéciation intracellulaire en métaux pourrait nous renseigner indirectement sur l'état physiologique d'un organisme.

La spéciation des métaux en solution est dominée par la complexation inorganique et organique, les réactions d'oxydoréduction, la précipitation-dissolution, l'adsorption-désorption et les facteurs du pH, la température, l'aération et la salinité. D'autres compositions de la solution, comme les matières organiques et les minéraux argileux, peuvent influencer la spéciation, la mobilité et la toxicité des métaux. Les métaux en solution se trouvent comme les ions libres, les complexes solubles avec les ligands inorganiques de SO_4^{2-} , Cl^- , OH^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , CO_3^{2-} et les ligands organiques comme les acides fulviques et humiques, les composées aromatiques et aliphatiques et l'acide carboxylique. La disponibilité d'un métal dans le milieu acide est plus grande, bien que la compétition des ions de H^+ peut

réduire et empêcher la liaison et le transport des métaux (Gadd, 2009). Chaque échantillon traité et aussi les échantillons témoins (l'échantillon sans ajout de Cd) ont été préparés en quatre répétitions pour les mesures de la densité cellulaire, de l'accumulation intracellulaire et de la fluorescence chlorophyllienne, et en huit répétitions pour les mesures du cytomètre en flux.

Tableau 3.1 Spéciation de Cd (%) à 25°C dans le milieu HSM et MAM en utilisant le logiciel de calcul de l'équilibre chimique (Visual MINTEQ 2.61).

pH = 7		[Cd] μ M				
Espèce chimique	<u>50</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>400</u>	<u>600</u>	
Cd ²⁺	12,35%	12,38%	12,44%	12,55%	12,66%	
CdCl ⁺	5,59%	5,66%	5,81%	6,08%	6,36%	
CdCl ₂	0,16%	0,16%	0,17%	0,18%	0,20%	
CdSO ₄	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%	
CdNH ₃ ²⁺	0,125%	0,125%	0,126%	0,127%	0,128%	
CdHPO ₄	81,40%	81,38%	81,26%	80,92%	80,54%	
CdEDTA ⁻²	0,35%	0,26%	0,18%	0,11%	0,08%	

pH = 4		[Cd] μ M				
Espèce chimique	<u>50</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>400</u>	<u>600</u>	
Cd ²⁺	33,14%	50,63%	59,32%	63,24%	64,15%	
CdCl ⁺	1,39%	2,39%	3,42	4,95%	6,32%	
CdSO ₄	12,71%	19,33%	22,44%	23,50%	23,42%	
Cd(SO ₄) ₂ ⁻²	0,86%	1,31%	1,51%	1,57%	1,55%	
CdHPO ₄	0,06%	0,09%	0,10%	0,11%	0,11%	
CdEDTA ⁻²	40,37%	20,45%	10,29%	5,16%	3,45%	
CdHEDTA ⁻	11,35%	5,75%	2,89%	1,44%	0,96%	
CdH ₂ EDTA	0,12%	0,06%	0,03%	0,02%	0,01%	
CdCl ₂	0,0%	0,0%	0,01%	0,02%	0,04%	

3.2.3 La mesure de la densité cellulaire

La croissance de *C. reinhardtii* et *C. acidophila* a été mesurée lors de l'exposition au cadmium en comptant le nombre de cellule après 24 h, 48 h et 72 h par la mesure de l'absorbance à 750 nm en utilisant le spectromètre UV-Vis. Le calcul de la densité cellulaire a

été basé sur une relation normalisée entre l'absorbance à 750 nm et la densité cellulaire mesurée par l'appareil Multisizer Z3.

3.2.4 La mesure de l'accumulation intracellulaire en cadmium

Les changements de poids sec ont été analysés lorsque les cultures d'algue ont été exposées pendant 72 h au Cd. Les résultats sont obtenus par la spectrométrie d'absorption atomique à flamme. Afin de mesurer la spectrométrie d'absorption atomique, les cellules d'algue traitées ont été filtrées sur le papier filtre en nitrate de cellulose. Pour retirer le Cd adsorbé sur la surface des cellules, les cellules filtrées ont été lavées avec 5 mL de 1mM de EDTA. Pour peser les cellules filtrées, elles ont été séchées à 32°C pendant 24 h. La concentration de cadmium intracellulaire a été déterminée après avoir terminé le processus de digestion en ajoutant 1 mL de HNO₃ concentré et 125 µL de peroxyde d'hydrogène à 30% sur les échantillons séchés et en chauffant dans le bain de sable à 120 °C pendant 12 h. Les échantillons ont été dilués en ajoutant 10 mL de l'eau nanopure, et les solutions stocks de Cd, pour la mesure de la spectrométrie d'absorption atomique, ont été préparés en ajoutant de l'acide nitrique concentré avec une concentration finale de 10% pour chaque échantillon. Les valeurs ont été ensuite normalisées par unité de masse.

3.2.5 Les mesures au cytomètre en flux

Les fonctions cellulaires et biochimiques induites en présence des ions métalliques de cadmium ont été évaluées en mesurant l'émission de fluorescence déterminant l'activité enzymatique d'estérases et en mesurant la lumière diffusée (FSC, SSC) à l'aide du cytomètre en flux.

Le cytomètre en flux réunit les cellules dans un seul flux. Les cellules passent individuellement à travers une lumière provenant d'une source monochromatique (*laser*) donnant des informations sur la morphologie cellulaire. Le détecteur de la lumière diffusée sous un angle de moins de 15° par rapport l'axe du faisceau incident (FSC) fournit les données sur la taille des cellules et les valeurs sous un angle de 90° par rapport l'axe du faisceau incident (SSC) donnent des informations sur la structure intracellulaire et la

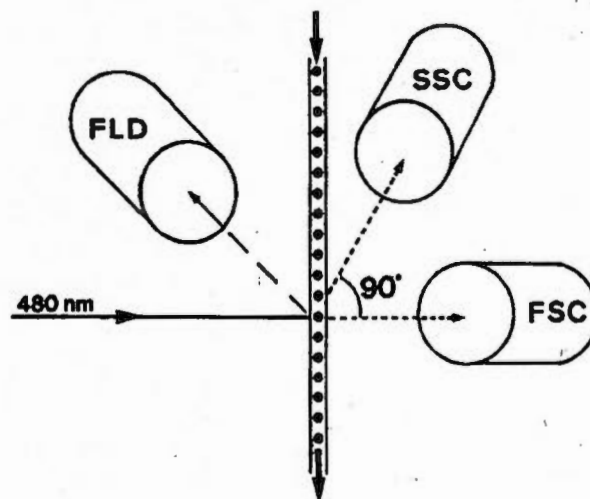


Figure 3.2 Représentation schématique de la cytométrie en flux. FSC, *forward scattering detector*; SSC, *side scattering detector*; FLD, *fluorescence detector* (Arsenault, Cvetkovic et Popovic, 1993).

granulosité des cellules (Figure 3.2) (Franklin *et al.*, 2001a). De plus, la mesure de l'intensité de la fluorescence de la Fluorescéine montre l'activité enzymatique d'estérases et l'intégrité de la membrane indiquant la viabilité cellulaire. Le diacétate de fluorescéine (FDA) est utilisé pour mesurer l'activité des enzymes estérases (Breeuwer *et al.*, 1995). La FDA est une substance non-polaire et non-fluorescente qui pénètre dans la cellule. Dans la cellule, la molécule de FDA va être brisée par les enzymes d'estérases et la Fluorescéine qui est une substance fluorescente va être produite. En conséquence, l'intensité de la Fluorescéine peut être utilisée comme un indicateur de l'activité métabolique et indirectement un marqueur de la viabilité cellulaire parce que les cellules mortes ne présentent pas d'activité métabolique et leurs membranes sont endommagées (Franklin *et al.*, 2001a). Les études de Franklin et ses collègues (2001a) ont montré que l'intensité de la fluorescence de la Fluorescéine chez *Selenastrum capricornutum* et *Entomoneis punctulata* a été diminuée en augmentant la concentration de cuivre lors d'exposition à court termes (1-24 h). Ils ont suggéré que l'absorption du cuivre dans la cellule et l'inhibition de l'activité des estérases étaient la raison de cette diminution. En fait, la fluorescence de la Fluorescéine montre les deux, la perméabilité de la membrane cellulaire et l'activité des enzymes estérases (Franklin *et al.*,

2001a). Cependant, la perméabilité à l'Iodure de propidium (PI) entre les échantillons traités au cuivre et les témoins a confirmé la diminution de l'intensité de la fluorescence de la Fluorescéine qui n'était pas liée à la diminution de l'absorption de FDA. Au contraire de la FDA, l'Iodure de propidium (PI) ne peut pas passer à travers les membranes cellulaires viables (Franqueira *et al.*, 2000). L'intensité de la fluorescence de la Fluorescéine de *Selenastrum capricornutum* a été augmentée lors de l'exposition à court termes (1-24 h) aux concentrations moins élevée de cuivre. Franklin et ses collègues (2001b) ont suggéré que cette augmentation venait de l'augmentation de l'absorption de FDA. Une augmentation de l'intensité de la fluorescence de la Fluorescéine par rapport au témoin a été observée chez *C. reinhardtii* lors d'une exposition à 48 h et 72 h à la concentration la plus élevée de Cd (100 μ M), et cette augmentation était plus importante après 48 h d'exposition (Jamers *et al.*, 2009). Ils ont supposé que cette augmentation était liée probablement à la participation des enzymes estérases dans la détoxification de Cd.

Dans notre travail, pour 500 μ L de chaque échantillon traité, 10 μ L de FDA (la solution préparée par la dissolution de 4,16 mg de FDA dans 1 mL d'acétone à 100%) a été ajouté et les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à la température ambiante avant la mesure. Le temps nécessaire à chaque mesure était de 90 sec et les données ont été enregistrées en mode logarithmique. À l'aide du logiciel WinMDI 2.8, l'analyse des données a été effectuée et les résultats ont été calculés en pourcentage du témoin.

3.2.6 La mesure de la fluorescence chlorophyllienne

L'activité photosynthétique est un indicateur de l'équilibre physiologique de la cellule algale et peut être mesuré par la fluorescence chlorophyllienne. Dans cette étude, la fluorescence chlorophyllienne a été mesurée comme un indicateur du transfert d'électrons dans l'appareil photosynthétique par la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne. Avant la mesure de la fluorescence, les échantillons d'algues traités ont été adaptés à l'obscurité pendant 20 min. Les échantillons d'algues ont été filtrés lentement sur un filtre de fibre de verre Millipore. Le volume nécessaire de cellules d'algues pour la filtration a été calculé à l'aide de la quantité totale de chlorophylle *a* + *b* (le minimum est équivalent à 5

µg/mL) obtenue par la méthode spectrophotométrique de Lichtenthaler qui est expliquée ci-dessous (Lichtenthaler, 1987) :

- Centrifuger 1 mL de culture d'algue (la vitesse maximum, 5 min).
- Jeter le liquide, ajouter 1 mL de méthanol à 100% (à l'obscurité), mélanger à l'aide d'agitateur (10 s) et incubé pour 15 min. Après avoir terminé le temps d'incubation, il faut centrifuger pour 5 min à la vitesse maximum.
- Mesurer l'absorbance pour chaque échantillon à 652,4 nm, 665,2 nm et 750 nm.
- Calculer la quantité totale de chlorophylle $a + b$ (µg/mL) à l'aide de l'équation 3.1:

$$Y (\mu\text{g/mL}) = (24.93 (A_{652.4} - A_{750}) + 1.44 (A_{665.2} - A_{750})) (\text{volume de méthanol} / \text{volume de culture d'algue}).$$

(3.1)

Le volume calculé pour chaque échantillon d'algue a été filtré à l'aide d'une seringue et la filtration doit se faire très lentement pour éviter de créer un stress sur les cellules. Pour chaque échantillon, la cinétique rapide de la fluorescence de 10 µs à 1 s a été mesurée par PEA en utilisant un flash saturant (3500 µmol de photons m⁻²s⁻¹) sous une faible illumination (verte). L'intensité de la fluorescence pour les transitions O-J-I a été déterminé à 20 µs, 2ms et 30 ms respectivement, et le rendement maximum de la fluorescence (FP) a été évalué sous une illumination saturante.

L'appareil Handy-PEA utilise une lumière fournie par trois diodes électroluminescentes (DEL) avec une haute intensité (3500 µmol de photons m⁻²s⁻¹). Celles-ci fournissent une lumière rouge d'une longueur d'onde maximale de 650 nm qui est facilement absorbée par les chloroplastes (le contenu infrarouge de la DEL est bloqué par des filtres (*short-pass filters*)). Le détecteur est une photodiode avec une haute performance associée au système amplificateur. Le système optique permet au détecteur de recevoir seulement les signaux de la fluorescence émis avec une longueur d'onde plus longue et en conséquence les longueurs d'onde courtes reflétées par les DELs ne peuvent pas être reçues par la photodiode. Avant la mesure de la fluorescence, les échantillons traités d'algues ont été adaptés à l'obscurité, Q_A devient donc oxydée au maximum et le centre réactionnel du PSII reste dans l'état ouvert et capable d'effectuer la réduction photochimique de Q_A. Après l'adaptation à l'obscurité, l'algue est exposée à une lumière saturante qui permet à Q_A d'être réduite par les électrons qui viennent du centre réactionnel du PSII (P680). Sur une durée de 1 sec, la

cinétique rapide représente un passage du rendement de fluorescence d'un niveau F_0 au niveau maximal F_M . La différence entre l'intensité de fluorescence lorsque tous les centres réactionnels sont ouverts (Q_A) et lorsque les centres réactionnels sont à l'état fermé (Q_A^-) donne la fluorescence variable qui dépend de la capacité photochimique du PSII.

CHAPITRE IV

CADMIUM BIOACCUMULATION EFFECT ON CELLULAR PARAMETERS OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* AND *CHLAMYDOMONAS ACIDOPHILA*

Mahshid Samadani, François Perreault, David Dewez*

University of Quebec in Montreal, Department of Chemistry

2101 Jeanne-Mance, Montréal, Québec, Canada

*corresponding author: dewez.david@uqam.ca

En préparation d'être soumis à *Science of Total Environment*

4.1 Résumé

Le cadmium (Cd) représente un des plus dangereux métaux contaminant l'environnement aquatique via les effluents d'eaux usées. Pour les organismes vivants, ce polluant peut devenir toxique à des concentrations faibles en raison de ses propriétés non essentielles pour les processus physiologiques cellulaires. Pour une application d'assainissement des eaux usées contaminées aux métaux, les effets de la bioaccumulation de Cd ont été comparés entre les algues vertes *C. reinhardtii* et *C. acidophila* dans le but de sélectionner l'espèce la plus résistante au Cd. En considérant le rôle du pH pour la spéciation des métaux dans le milieu et donc leur disponibilité pour les organismes vivants, la bioaccumulation et les fonctions cellulaires et biochimiques ont été analysées et comparées lorsque les algues étaient exposées pendant 72 heures aux différentes concentrations de Cd (50-600 μM) correspondant à 6.173, 12.383, 24.887, 50.212 et 75.954 μM en ion libre de Cd^{2+} à pH=7 et correspondant à 16.572, 50.629, 118.640, 252.940 et 384.870 μM en ion libre de Cd^{2+} à pH=4. L'espèce *C. reinhardtii* a montré une capacité d'accumulation intracellulaire en Cd plus élevée par rapport à *C. acidophila*. La division cellulaire et le transport des électrons photosynthétiques dépendant de l'accumulation intracellulaire en Cd ont montré une réduction lors de l'exposition aux concentrations plus élevées de Cd chez *C. reinhardtii* indiquant la faible tolérance de cette espèce contre les effets toxiques de Cd. Les changements cellulaires plus élevés dans la taille et la granulosité chez *C. reinhardtii* s'expliquent par l'inhibition de la division cellulaire et les dommages cellulaires. Mais l'activité des enzymes estérases reste élevée chez *C. reinhardtii* malgré l'accumulation maximum de Cd à 24h, montrant leurs participations à la détoxification du Cd. À faible pH, l'exclusion à la suite de la compétition des ions de H^+ avec les ions de Cd^{2+} pour la liaison à la surface d'algue a empêché l'accumulation intracellulaire en Cd chez *C. acidophila*. Les changements plus élevés dans la granulosité à 48h indiquent probablement l'exclusion. Donc, l'accumulation du Cd en dehors du cytosol entraîne les débris de membrane puis une augmentation significative de la granulosité et la diminution de l'intensité de la fluorescence de Fluorescéine (FDA) à cause de la membrane endommagée. Par conséquent, ces résultats montrent les limitations dans l'utilisation de ces souches d'algues vertes sous deux différents pH, dans une approche d'assainissement des eaux usées.

4.2 Abstract

Cadmium (Cd) represents one of the most dangerous metals found in aquatic environment which can be toxic at low concentrations due to its non-essential properties for cellular physiological processes. For the removal of heavy metals from wastewaters, a new bioremediation approach was studied by the comparison of Cd bioaccumulation effect on algal cells between green algae *C. reinhardtii* and *C. acidophila* with the aim to select most resistant strain to Cd. Acidic waters often contain high amounts of dissolved metals and the capacity of cells to accumulate Cd was compared during 72 h to increasing concentrations of Cd (50-600 μM) at two different pH (4 and 7), and consequently the change of cellular and biochemical parameters indicating cell division, cellular morphology, esterases enzymatic activity and Chl *a* fluorescence were measured and compared. Here, cellular physiological and biochemical differences for *C. acidophila* were observed in comparison to *C. reinhardtii*. The change of cell density and Chl *a* fluorescence were related to bioaccumulation processes and sequestration of Cd into algal cells. *C. reinhardtii* showed high capacity to accumulate Cd but growth inhibition and reduction of photosynthetic performance indicated low tolerance of this strain against the toxic effects of Cd in comparison to *C. acidophila*, especially when exposed to the highest concentrations of Cd. Significant changes in the cell size and granularity of *C. reinhardtii* demonstrated the inhibition of cell division and cell damage, but the fluorescence intensity of Fluorescein concerning esterases enzymatic activity showed no change compared to control in this strain, indicating their participation in the detoxification of Cd. At low pH, exclusion, following the competition of H^+ with Cd^{2+} ions for binding sites within the cell wall led to less intracellular bioaccumulation of Cd in *C. acidophila*. Furthermore, significant changes in the cell granularity at 48 h probably indicated the exclusion, and therefore more Cd accumulation out of the cytosol caused membranous debris that are confirmed by our confirmed results. Therefore, this study showed the limitation in the use of these strains of green algae in the development of a new bioremediation approach for wastewater treatment.

Keywords: Cadmium, bioaccumulation, green algae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas acidophila*, cellular parameters, cytotoxicity.

4.3 Introduction

Cadmium (Cd) represents one of the most dangerous metals for human health (Bernard, 2011) which for the general population, food and drinking water were considered to be the most common exposure pathway (Adriano *et al.*, 2005). Cadmium is released in soil, water and atmosphere by heating systems, metallurgic industries, waste incinerators, urban traffic, factories of cement and also as a by-product of phosphate fertilizers (Benavides, Gallego et Tomaro, 2005 ; Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). For instance in Canada, the National Pollutant Release Inventory (NPRI) reported in 2011 that 2739 kilograms (kg) of Cd were released into water from wastewater and sewage systems. Therefore, it is evident that Cd represents a deleterious contaminant for water quality, and different strategies to limit its input into water reservoirs should be established to reduce its impact on aquatic ecosystems.

Water remediation is still a current research topic since industries continue to reject into their wastewater many toxic metals. In earlier studies, it has been shown that conventional methods such as ion exchange, electrolysis, precipitation, filtration or evaporation were used for the removal of trace metals from aqueous solutions, but these methods were expensive. Large quantities of reagents and high energy are required for traditional methods such as chemical precipitation and reverse osmosis, making these conventional approaches less practical for low concentrations of trace metals or large volumes (Aderhold, Williams et Edyvean, 1996 ; Eccles, 1999). Recently, the use of microalgae in the bioremediation of wastewater constitutes a promising low-cost alternative approach. Microalgae are known to have the capacity for metals uptake and they can be used as biosorbents for trace metals from their environment. Their unicellular nature offers a large surface area to volume ratio which increases the contact between pollutants and the cell. Metals are taken up by algal cells via channel-mediated, the transportation specific consuming the energy and passive (biosorption) pathways, in which they are accumulated inside the cellular vacuole, where they are complexed to reduce toxic effects induced by free metal ions (Das, Vimala et Karthika, 2008 ; Gadd, 2009 ; Sheng *et al.*, 2004). Compared to conventional methods, the use of microalgae in wastewater treatment does not lead to secondary pollution. Indeed, they are able to use inorganic nitrogen and phosphorus for their growth and to remove trace metals of effluents resulting from primary and secondary

processes of domestic, industrial and agriculture treatments (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et Ibraheem, 2012). Furthermore, the biomass produced can be used for various applications including the production of biogas from anaerobic digestion, such as CH₄ and CO₂ (Muñoz *et al.*, 2005).

Algal species were found to differ in their capacity to accumulate and acclimate to metal contamination (Baumann, Morrison et Stengel, 2009 ; Juneau, El Berdey et Popovic, 2002 ; Perreault *et al.*, 2010). For bioremediation applications, a better understanding of metals (as Cd) uptake and sequestration activities in the cell of metal-accumulating strains will provide the possibility to develop new bioremediation strategies for polluted water. In this context, *Chlamydomonas* species is an appropriate unicellular model organism for the study of cellular functions related to metals bioaccumulation and tolerance processes. *Chlamydomonas reinhardtii* is well-known to be able to acclimate to changing growth conditions (Davies et Grossman, 1998 ; Hanikenne, 2003). The capacity of *C. reinhardtii* to accumulate and detoxify contaminants was proposed as an interesting biotechnological approach for the decontamination of organic pollutants (Wang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2011). In addition, *C. acidophila*, an acidophilic *Chlamydomonas* species, was shown to possess high tolerance to several metal ions (Nishikawa et Tominaga, 2001 ; Perreault *et al.*, 2010 ; Spijkerman *et al.*, 2007). The mechanisms implicated in the metal resistance of *C. acidophila* are still unclear, although the participation of glutathione peptides (Nishikawa, Onodera et Tominaga, 2006), heat-shock proteins (Gerloff-Elias *et al.*, 2006), positive charge at cell surface (Gimmler, 2001b ; Gimmler *et al.*, 1991) and photosynthetic photoprotection mechanisms (Perreault *et al.*, 2010) were identified as processes influencing the cellular response to metal exposure. However, the utilisation of metal-resistant *C. acidophila* was not evaluated for metal bioremediation applications.

In bioremediation application, the selection of algal strains must consider both the capacity of cells to uptake metals and the intracellular tolerance of metal toxic effects. Deleterious effects induced by toxic metal ions may limit the bioaccumulation capacity of cells. Growth inhibition (Okamoto *et al.*, 1996 ; Prasad *et al.*, 1998), ultrastructural changes (Aguilera et Amils, 2005 ; Gimmler, Jesus et Greiser, 2001a ; Jamers *et al.*, 2009 ; Nishikawa *et al.*, 2003 ; Visviki et Rachlin, 1994) and reduction of photosynthetic performance (Faller,

Kienzler et Krieger-Liszkay, 2005 ; Mallick et Mohn, 2003 ; Perreault *et al.*, 2011 ; Vega *et al.*, 2006) have been reported in response to cadmium effects on algae. In previous studies, it has been shown that photosystem II is a sensitive site of Cd inhibition in which Cd^{2+} binds competitively to the essential Ca^{2+} site during photoactivation, causing the inhibition of the water splitting system (Faller, Kienzler et Krieger-Liszkay, 2005). Also, it has been found that Cd reduced the electron transport capacity of both photosystems, PSII and PSI (Perreault *et al.*, 2011).

Furthermore, in toxicological investigations, flow cytometry analysis was used to measure algal cell characteristics from light-scattering or fluorescence properties by intracellular pigments or fluorescent probes. This methodological approach was used to assess cellular toxicity effects and mechanism of action for metals on unicellular algae (Abalde *et al.*, 1995 ; Franklin *et al.*, 2001a ; Jamers *et al.*, 2009). Therefore, different cellular characteristics can be used to analyse the effect of Cd on algal cells, such as density of cells, cellular viability, photosynthetic activity and enzymatic activities.

In this study, cellular characteristics of *Chlamydomonas acidophila*, known as a tolerant *Chlamydomonas* strain to metals (Nishikawa et Tominaga, 2001), were compared with those of *C. reinhardtii*, a wild type unicellular model (Harris, 2001), when exposed to Cd at two different pH (pH=7 and pH=4). The advantages and disadvantages for both species were investigated concerning their bioremediation performance in the removal of Cd from aqueous solution. Acidic waters often contain high amounts of dissolved metals and the goal of the present study was to consider both the capacity of cells to accumulate and tolerate Cd at two different pH. During 72 h to increasing nominal concentrations of Cd, the bioaccumulation of Cd and consequently the change of cellular parameters were analyzed and compared. Under these experimental conditions, measured cellular and biochemical parameters were indicative of cell division, cellular morphology, esterases enzymatic activity and chl *a* fluorescence in both species.

4.4 Material and methods

4.4.1 Biological material

Green alga *Chlamydomonas reinhardtii* wild type (CC-125) was obtained from the *Chlamydomonas* Resource Center (Duke University, Durham, NC) and cultivated in 1-L batch culture of high salt growth medium (HSM) (Harris, 1989). Alga *Chlamydomonas acidophila* (CPCC-121) was obtained from the Canadian Phycological Culture Centre (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada) and cultivated in 1-L batch culture of modified acid medium (MAM) (Olaveson et Stokes, 1989) at pH=4. Cultures were grown under continuous illumination of $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ provided by white fluorescent lamps (Sylvania Grolux F36W) and constant temperature of $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Cultures were permanently aerated to maintain constant CO_2 concentration in the growing medium. In the exponential growth phase, cell densities were determined by using a cell counter Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc). Glasswares were acid-washed in 10% HNO_3 for 12 h before use to prevent contamination of cultures, stock solutions and test samples with metals.

4.4.2 Cadmium treatment

Cadmium stock solution of 600 mM was prepared from CdCl_2 (Anachemia) salt dissolved in purified water (Thermo Scientific Barnstead Nanopure ultrapure water purification system). For experiments, samples of algal cells having density of 5×10^5 cells mL^{-1} were taken from stock culture during exponential growth phase. Algal samples were exposed during 72 h to different concentrations of Cd (between 50 and 600 μM) in final volume of 20 mL growth medium. Sample with no addition of Cd was considered as control. Erlenmeyer flasks were placed on agitator platforms (constant rate of 100 rpm) under the same illumination and temperature conditions used for growth culture. During treatment period, measurements of cell density, Cd bioaccumulation, cell size and granularity, esterases enzymatic activity and Chl *a* fluorescence were determined. Each control and treatment conditions were performed in four replicates for bioanalytical measurements and eight replicates for flow cytometric analysis. Cadmium speciation was computed at 25°C in both HSM and MAM growths medium by chemical equilibrium calculation using Visual MINTEQ 2.61 (KTH, Department of Land and Water Resources Engineering, Stockholm, Sweden).

4.4.3 Cell density

Cell density was evaluated monitoring culture absorbance at 750 nm using a spectrophotometer UV-Vis (Lambda 40, Perkin-Elmer, Woodbridge, Canada). The evaluation of cell density was based on a linear regression between absorbance at 750 nm and cell count measured with a Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA).

4.4.4 Cd bioaccumulation

To determine the bioaccumulation of Cd, algal samples were filtered on cellulose nitrate filter paper (Millipore 0.45 μm) and cells were washed with 5 mL of 1 mM EDTA to remove adsorbed Cd on cell surface. Algal cells on filter were dried at 32°C for 24 h before dry weight measurement. The digestion process was done on the filter dried sample immersed in 1 mL of concentrated HNO_3 and 125 μL of 30% hydrogen peroxide (Caledon laboratory chemicals) at 120°C for 12 h. Cd concentration was determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS, Varian spectrAA 220 FS). Prior to measurement, samples were diluted to 10% HNO_3 by adding 10 mL of purified water. The values were then normalized per mass unit (mg of Cd/mg of dry weight). For FAAS measurement, standard solutions of cadmium were prepared with a final concentration of 10% HNO_3 (Perreault *et al.*, 2010).

4.4.5 Flow cytometry analysis

A FacScan flow cytometer (Becton Dickinson instrument) was used to determine cellular parameters as the relative cell size and granularity based on forward and side scattering properties. The relative cell size was determined by the forward light scatter signal (FSC) and the cell granularity was estimated by the side light scatter signal (SSC) (Franklin, Stauber et Lim, 2001b). Results on cell morphology were expressed as a percentage of the control.

Fluorescein diacetate (FDA, Invitrogen Molecular Probe, Eugene, OR) was used as a probe of esterases enzymatic activity (Breeuwer *et al.*, 1995). Measurement of esterases activity was based on green fluorescence emission of fluorescein (Franklin, Stauber et Lim, 2001b). Stock solution of FDA was prepared by dissolving 4.16 mg in 1 mL of 100% acetone. Before analysis, 10 μL of prepared FDA was added to 500 μL of algal sample, and incubated

for 10 min at room temperature. Fluorescence measurement was expressed in logarithmic scale recorded with the photomultiplier tube. The time required for building each fluorescence histogram was 90 sec, recording a total of 100000 events per sample at a flow rate of 12 $\mu\text{L min}^{-1}$. Data were collected using the list mode, analysed by WinMDI 2.8 software and results were expressed as a percentage of the control.

4.4.6 Chl *a* fluorescence

Prior to fluorescence measurements, algal samples were dark-adapted for 20 min with frequent manual stirring to keep oxygenation. Samples of algal cells, corresponding to 10 μg of total Chl, were uniformly placed on glass fiber filter (Millipore No. AP2001300) by using low pressure filtration to avoid physiological stress effect. Rapid Chl *a* fluorescence induction from 10 μs to 1 s was measured with a "Plant Efficiency Analyzer fluorometer" (Handy-PEA, Hansatech Ltd., Norfolk, UK) using a saturating flash of 3500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fluorescence intensity at 20 μs was considered to be the O transient, noted as $F_{20\mu\text{s}}$. Variable fluorescence intensities at J and I transients were determined at 2 ms ($F_{2\text{ms}}$) and 30 ms ($F_{30\text{ms}}$), respectively. The maximum fluorescence yield reached maximal value of fluorescence intensity under saturating illumination (Strasser, Tsimilli-Michael et Srivastava, 2004). Fluorescence parameters were determined according to Force *et al.*, 2003 and Strasser *et al.*, 2004: The PSII maximal quantum yield, indicating efficiency of light energy transfer to PSII primary photochemistry, was determined by the ratio between variable fluorescence (F_V) and maximal (F_M) as $F_V/F_M = (F_M - F_{20\mu\text{s}})/F_M$. The ratio between absorption of photons by chlorophyll antenna complex and photochemically active PSII reaction centers was determined as $\text{ABS/RC} = (M_0/V_J)/(F_V/F_M)$. The parameter M_0 representing the net rate of PSII reduced by electron transport was determined as $M_0 = [4 \times (F_{300\mu\text{s}} - F_{20\mu\text{s}})/(F_M - F_{20\mu\text{s}})]$. The parameter V_J representing the proportion of Q_A reduced relative to the plastoquinone pool was evaluated as $V_J = [(F_{2\text{ms}} - F_{20\mu\text{s}})/(F_M - F_{20\mu\text{s}})]$ (Force, Critchley et van Rensen, 2003 ; Strasser, Tsimilli-Michael et Srivastava, 2004). The performance index of PSII activity was evaluated as $\text{P.I.} = [(F_{2\text{ms}} - F_{20\mu\text{s}})/4 \times (F_{300\mu\text{s}} - F_{20\mu\text{s}}) \times F_V/F_M] \times (F_V/F_{20\mu\text{s}}) \times ((1-V_J)/V_J)$ (Strasser, Tsimilli-Michael et Srivastava, 2004).

4.4.7 Data analysis and statistics

All experiments were done in 4-8 replicates. Means and standard deviations were estimated for each treatment. Significant differences with the control were determined using a One-way ANOVA with Dunnett test. All statistical analysis were done with Prism 5 software and p values less than 0.05 were considered as significant.

4.5 Results

4.5.1 Metal speciation

Cadmium speciation was computed at 25°C in both growth media (HSM and MAM) by chemical equilibrium calculation using Visual MINTEQ 2.61. Table 4.1 shows the total percentage of Cd species in both growth media. Concentrations of 6.173, 12.383, 24.887, 50.212 and 75.954 μM of free Cd^{2+} ions were determined in HSM culture media for respective concentrations of Cd used, and 16.572, 50.629, 118.640, 252.940 and 384.870 μM of free Cd^{2+} ions were determined in MAM. It is important to determine Cd speciation since the soluble form as Cd^{2+} is more bioavailable to be uptake by algal cells. Results indicated that the total percentage of free Cd ions at pH=4 is higher than pH=7.

4.5.2 Change of cell density

Figure 4.1 shows the growth results of algal species upon exposure to Cd and obtained by measuring cellular division during 72 h. Growth of all cultures treated during 72 h to different concentrations of Cd was affected in concentration and time dependent manner. The cell division of *C. reinhardtii* upon exposure to 400 and 600 μM of Cd was strongly inhibited (Figure 4.1 A). The cell density showed a decrease of 54% relative to the control in *C. reinhardtii* at 72 h of exposure to 400 μM ($p<0.05$). On the other hand, this decrease was of 41% and 29% compared to the control in *C. acidophila* exposed at pH 7 and 4, respectively ($p<0.05$). When *C. reinhardtii* was exposed 72 h to 600 μM of Cd, a reduction of cell density was noticed by 59% relative to the control ($p<0.05$). However, under the same treatment conditions, the cell density of *C. acidophila* reduced by 39% and 43% compared to the control at pH=7 and pH=4, respectively ($p<0.05$) (Figure 4.1 A, B, C). So, the growth of *C. acidophila* in both medium indicated that cellular division was not strongly inhibited at the highest concentration of Cd and the change of cell density was independent to the change of pH (Figure 4.1 B, C).

4.5.3 Bioaccumulation of Cd

Algal species have different sensitivities to accumulate and tolerate metals, especially in acidic environment where metals are more soluble and thus bioavailable to aquatic organisms (Nishikawa et Tominaga, 2001). Therefore, the capacity of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* to accumulate Cd was investigated and compared. The percentage of intracellular Cd accumulation was calculated for the highest concentrations of 400 and 600 μM using the total percentage of the free Cd^{2+} ions in both growth media. Figure 4.2 C shows that algal biomass of *C. acidophila* at pH=4 accumulated less Cd than both algal species at pH=7. When *C. acidophila* was exposed 24 h to 400 and 600 μM of Cd at pH=4, the intracellular Cd accumulation was respectively 0.12% and 0.13% ($p<0.05$) in comparison to the total of free Cd^{2+} ions in the medium. Under the same treatment conditions but at pH=7, the intracellular Cd accumulation in algal cells of *C. reinhardtii* was respectively 18.85% and 21.80% ($p<0.05$), while cells of *C. acidophila* accumulated respectively 10.56% and 16.42% ($p<0.05$) of Cd in comparison to the total of free Cd^{2+} ions in the medium. Under this pH condition, the bioaccumulation of Cd in algal cells reached its maximum for both species when exposed to 600 μM of Cd at 24 h (Figure 4.2 A, B). Based on these results, algal cells of *C. reinhardtii* were accumulating more Cd than cells of *C. acidophila*.

4.5.4 Cellular morphology

Analysis of cell structural characteristics, such as the cell size and granularity, was done with the measurement of forward and side light scattered in the flow cytometry system. Algal cells of *C. reinhardtii* showed an increase in cell size significantly higher than control, especially for cells exposed 72 h to the highest concentrations of Cd (400 and 600 μM) (Figure 4.3 A). When *C. reinhardtii* was exposed 24 h to 400 and 600 μM of Cd, the relative cell size showed respectively an increase of 19% ($p>0.05$) and 84% ($p<0.05$) in comparison to control. Under the same treatment conditions, this increase was equal respectively to 75% and 119% ($p<0.05$) at 48 h of exposure, and the relative cell size increase by 93% and 120% ($p<0.05$) compared to control in *C. reinhardtii* at 72 h. Significant changes in the FSC signal indicating the cell size was not found for *C. acidophila* grown under both pH and exposed 72 h to the highest concentrations of Cd (400 and 600 μM) (Figure 4.3 B, C).

The SSC signal indicating the cell granularity showed the same trend as the FSC signal for *C. acidophila* cells cultivated at pH=7 and exposed 72 h to the highest concentrations of Cd (400 and 600 μ M) (Figure 4.4 B). In *C. reinhardtii* exposed to 600 μ M of Cd, the cell granularity increased significantly ($p<0.05$) in comparison to the control by 57% at 24 h and by 55% at 72 h. The cell granularity increased significantly ($p<0.05$) compared to control for Cd exposure of 48 and 72 h in *C. acidophila* cells cultivated at pH=4, but no differences were noticed at 24 h (Figure 4.4 C). Indeed, the cell granularity of *C. acidophila*, exposed 48 h at pH=4 to 400 and 600 μ M of Cd, showed an increase by 9.5 and 10 fold higher than the control. This increase was equal to 2.5 and 3.5 fold higher than the control after 72 h of exposure to 400 and 600 μ M of Cd, respectively.

4.5.5 Esterases enzymes activity

The change in fluorescence intensity of fluorescein as the product of FDA hydrolysis can be used as a viability marker related to the enzymatic activities of esterases (Franklin, Stauber et Lim, 2001b). Figure 4.5 A shows that the fluorescence intensity of fluorescein did not significantly changed compared to control in *C. reinhardtii* cells exposed to 400 and 600 μ M of Cd. Furthermore, the fluorescence intensity of fluorescein showed no change compared to control during 72 h in *C. acidophila* grown under both pH (pH=7 and pH=4 (Figure 4.5 B, C).

4.5.6 Fluorescence measurements

Since the bioaccumulation of Cd reached a maximum at 24 h for both species, the O-J-I-P Chl *a* fluorescence kinetic was determined at 24 h as an indicator of Cd effect on Photosystem II (PSII) electron transport. Algal cells of *C. reinhardtii* demonstrated a decrease of fluorescence intensity under Cd exposure of 200 μ M. In Table 4.2, the maximum PSII quantum yield showed a decrease of 7% ($p<0.05$) relative to the control for *C. reinhardtii* cells exposed 24 h to 200 μ M of Cd, while this decrease was of 4% and 5% in *C. acidophila* cells exposed at pH=7 and pH=4, respectively ($p<0.05$). The change of ϕ_{PO} parameter for cells exposed to 200 μ M of Cd was similar with the cells exposed to 400 and 600 μ M of Cd ($p<0.05$). The performance index of PSII (P.I.) for algal cells exposed to 200 μ M of Cd showed a significant decrease of 60% ($p<0.05$) relative to the control in *C.*

reinhardtii. In comparison, *C. acidophila* exposed at pH=7 and pH=4 showed respectively a decrease of 26% and 16% compared to control ($p<0.05$). A significant ($p<0.05$) increase of 34% compared to control was observed for the ratio of ABS/RC in *C. reinhardtii* cells exposed to 200 μM of Cd, whereas this increase was only of 2% and 5% for *C. acidophila* cells cultivated at pH=7 and pH=4, respectively ($p>0.05$).

4.6 Discussion

4.6.1 Bioaccumulation effect of Cd on cellular division

The wild-type phenotype *C. reinhardtii* (CC-125) was chosen for comparison with other strain *C. reinhardtii* in terms of toxic response to Cd. Acidophilic algae are able to minimize proton fluxes from the medium into the cells, and consequently maintaining intracellular pH in the neutral range (Gimmler, 2001b). The strain CPCC 121 (chosen as tolerant metal strain isolated in Canada) is less acidophilic than others *C. acidophila*. However, it possesses an optimum pH (~7) of growth similar to that of *C. reinhardtii* while keeping a good tolerance at low pH.

The Cd toxic response was evaluated by measuring the change of cell density during 72 h. The effect of Cd noticed on cellular division was different for *C. acidophila* compared to *C. reinhardtii* at the highest concentrations of 400 and 600 μM of Cd, and this effect was similar for *C. acidophila* in both growth media (pH=7 and pH=4). Therefore, it is most likely that *C. acidophila* is more tolerant than *C. reinhardtii* against the exposure to the highest concentrations of Cd. However, at low pH, the proportion of free Cd ions is higher in the medium for *C. acidophila*, demonstrating no correlation with the change in external pH.

The results of Cd uptake in this study indicated that *C. reinhardtii* was accumulating more Cd than *C. acidophila* at pH=7. This indicated that alga *C. acidophila* possesses better protection mechanisms limiting the uptake of Cd into the cell. Indeed, it has been shown that the cell wall can act as a barrier for the uptake of metals such as Cd at low concentrations in algal cells of *C. reinhardtii* (Macfie, Tarmohamed et Welbourn, 1994). At pH=7, the highest amount of Cd uptake for both species happened at 24 h suggesting two mechanisms: It reflects mechanisms of acclimation which protect these algal species against the exposure to Cd and reducing Cd uptake after 48 h and 72 h. The other hypothesis can be a decrease in

cellular viability reducing the population of active cells for Cd accumulation after 48 h and 72 h. Since this change was not observed, considering our results, it confirms that the maximum accumulation of Cd at 24 h is due to the first hypothesis which means that different mechanisms of acclimation are involved during long-term exposure to Cd with the aim of reducing Cd uptake. This hypothesis is more interesting considering of the strong inhibition of cell division for *C. reinhardtii* after 48 h and 72 h of exposure to the highest concentrations of Cd, and also no change in cellular viability that might be correlated to the participation of esterases enzymes in the detoxification of intracellular Cd. Macfie *et al.*, (1994) concluded that sensitive sites inside or on the surface of the cell wall have the capacity to bind metal ions and prevent its uptake into the cell. If at pH=7 more accumulation of Cd appeared for *C. reinhardtii* under Cd treatment of 400 and 600 μM , it could explained the hypothesis of Macfie *et al.*, (1994) based on saturation of metal binding sites on the cell wall.

At pH=4, it seems that *C. acidophila* is more capable to limit Cd uptake. It seems that *C. acidophila* employed other strategies such as exclusion at low pH which did not allowed high uptake of Cd. As a matter of fact, plant cells have developed different metal-tolerance mechanisms to control availability of unwanted chemical elements, especially those considered biologically non-essential such as Cd (Benavides, Gallego et Tomaro, 2005 ; Gallego *et al.*, 2012 ; Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). Gimmler *et al.*, (1991) reported the role of positive zeta potential as an effective protection mechanism against the effect of toxic metals in acido-tolerant alga *Dunaliella acidophila* (optimal growth at pH=1). Indeed, it was reported that all acidophilic strains possess positive zeta potentials, causing metals and acid resistance. Trace metal cations increase positive zeta potential of *Dunaliella acidophila* at acid pH, because of their binding to plasma membrane decreasing its negative zeta potential at pH=7 (Gimmler *et al.*, 1991). Our results showed less accumulation of Cd in *C. acidophila* at pH=4 compared with its accumulation at pH=7. Positive zeta potentials on cell wall caused repelling forces for cations and decreasing proton fluxes from the medium into the cells. Therefore, less cationic metals from the acid pH medium succeeded to enter the cell (Gimmler, Jesus et Greiser, 2001a). In addition, Parent and Campbell (1994) reported a decrease of toxic effects of Al^{3+} on *Chlorella pyrenoidosa* growth because of the competition of H^+ with Al^{3+} ions for binding sites at the cell wall surface (Parent et Campbell, 1994).

Then, regarding the negative zeta potential measured at two different pH, we hypothesized exclusion as a result of the competition of H^+ with Cd^{2+} for binding sites with the cell wall leading to less accumulation of Cd in *C. acidophila* cells at pH=4.

Our results confirm the importance the cell wall as a barrier for the uptake of metals into the cell. Macfie *et al.*, (1994) investigated the toxicity of Cd, Co, Cu and Ni on the growth of two strains of *C. reinhardtii*, a cell walled and a cell wall-less strain by considering the pH. They reported that the cell walled strain possesses higher cell densities than the cell wall-less strain within each pH (5 and 6.8) for all treatment. Our results indicated that *C. acidophila* was more tolerant than *C. reinhardtii* at high Cd concentrations and that was more interesting, in spite of more Cd accumulation in *C. acidophila* cells at pH=7 compared to pH=4, moreover there was no significant difference in the inhibition of cell division confirming the use of better mechanisms of detoxification and protection in *C. acidophila*. Therefore, the inhibition of cell division in *C. acidophila* at pH=4 showed cellular alteration because of Cd uptake and more proportion of free Cd ions at low pH, but its difference with *C. reinhardtii* indicated different mechanisms of acclimation to high Cd concentration.

4.6.2 Alteration of cellular characteristics

Flow cytometry represents a useful technique for the investigation of toxicity in algal cell, allowing the analysis of structural characteristics of the cell size and granularity (Franklin, Stauber et Lim, 2001b ; Franqueira *et al.*, 2000 ; Jamers *et al.*, 2009). In a previous study, *C. reinhardtii* exposed to 72 h to Cd showed a strong increase in cell size (Jamers *et al.*, 2009). It was reported that *C. reinhardtii* cells exposed to 5 μM of Cd after 72 h were significantly larger than control. Similarly, our results showed an increase in cell size of *C. reinhardtii* for cells exposed to 72 h to 400 and 600 μM of Cd indicating cellular alteration. Franqueira et al (2000) reported an increase of the FSC signal in *P. tricornutum* after 96 h exposure to 1 mg l^{-1} of copper. Rioboo et al (2002) found that the cell volume of *Chlorella vulgaris* was strongly increased after 96 h of exposure to the highest concentrations of two herbicides, isoproturon and terbutryn. They hypothesized the growth inhibition as possible mechanism to explain their results (Rioboo *et al.*, 2002). This hypothesis is in agreement with our results regarding the inhibition of cell division and the increase of relative cell size in *C. reinhardtii* compared to *C. acidophila*. However, the results of this study demonstrated no

cellular alteration related to the increase of cell size in *C. acidophila* for both pH conditions and cells exposed to 72 h to 400 and 600 μM of Cd. The change of cell size showed no significant difference in spite of more uptake of Cd in *C. acidophila* at neutral pH in comparison to its change at low pH when treated to 72 h with Cd concentrations of 400 and 600 μM , confirming better cellular detoxification mechanisms of *C. acidophila*.

Based on our results, the cell granularity increased for *C. reinhardtii* cells exposed to Cd. The results obtained by Jammers *et al.*, (2009) showed an increase in the cell granularity with increasing Cd concentration (100 μM) after both 48 and 72 h of exposure. It has been reported cytoplasmic vacuolizations, development of membranous organelles, lipid accumulation, starch accumulation and cytoplasmic electron-dense granules accumulation in response to metals in algae and protozoa. It was observed vacuolated cytoplasm and chloroplasts in the majority of cells (95%) of marine diatom *Skeletonema costatum* exposed to 0.2, 0.5 and 1 mg/L of Cd (Nassiri *et al.*, 1997). They reported that the Cd was only sequestered in the spherical vacuolar inclusions which were enriched by sulfur and nitrogen, and they suggested that Cd was probably bounded to organic molecules via S-Cd bonds reducing the cytosolic concentrations of Cd. The number and volume of cytoplasmic vacuoles increased in *Chlamydomonas sp* exposed to 0.2 mM of Cd (Aguilera et Amils, 2005). Cytoplasmic vacuolization was also observed in *Chlamydomonas bullosa* cells when exposed to low levels of Cd (Visviki et Rachlin, 1994). In spite of the increase in total cell volume and the decrease in cell wall volume of this strain, the periplasmalemmal space did not change so they suggested that this vacuolization was not due to the osmotic disorganization. Moreover, it has been reported that structural constituents of the cell wall and binding to anionic groups of the plasma membrane can be influenced by exclusion (Gimmler, Jesus et Greiser, 2001a). Based on our results, we assumed that ultrastructural changes were related to the increase of the cell granularity in *C. reinhardtii*. However, our results demonstrated no cellular alteration correlated with the cell granularity increase in *C. acidophila* at pH=7, and indicated better mechanisms for the removal of intracellular Cd. At pH=4, we assumed that the exclusion caused more Cd accumulation out of the cytosol which may be influenced by the cell wall, the periplasmalemmal and the plasma membrane.

In spite of maximum Cd accumulation at 24 h in *C. reinhardtii* and *C. acidophila* at pH=7 exposed to the highest Cd concentrations, there was no significant difference in FDA signal compared to the control. Jamers *et al.*, (2009) detected an increase of fluorescein fluorescence in *C. reinhardtii* for high Cd concentration (100 μ M) after 48 and 72 h of exposure. They suggested that this increase was related to the esterases enzymes involved in detoxification processes. We assumed that the level of esterases enzymes was remained high for both strains at pH=7, because of their participation in intracellular detoxification.

Fluorescein fluorescence reflects the changes in both cell membrane permeability and esterases activities within the cell (Franklin *et al.*, 2001a). In our study there was no significant difference in Fluorescein fluorescence in *C. acidophila* grown at low pH during 72 h exposure with 400 and 600 μ M of Cd. We assumed that the exclusion caused less Cd accumulation inside of the cytosol so there was no change in the level of esterases enzymes. Moreover, it can be due to the exclusion and damage to the membrane so FDA was not able to penetrate into the cell. Furthermore, concerning the results of cell division in *C. acidophila* at pH=4 that showed cellular alteration, the results of the FDA test indicate the role of the esterases enzymes in detoxification processes. Therefore, our results confirmed that the cell granularity is a good criterion for the investigation of the effect of Cd on both inside and outside of cellular cytosol in *Chlamydomonas* species.

4.6.3 Alteration of photosynthetic electron transport

The bioaccumulation effect of Cd on PSII electron transport was investigated using the change of photosynthetic based fluorescence parameters and it was compared for both strains *C. reinhardtii* at pH=7 and *C. acidophila* at two different pH. Considering the maximum Cd accumulation, the rapid Chl *a* fluorescence kinetic was determined at 24 h. The maximum PSII quantum yield, shown by the ratio F_v/F_m , showed a decrease of 7% ($p<0.05$) relative to the control in *C. reinhardtii* exposed to 200 μ M of Cd, while this decrease were of 4% and 5% in *C. acidophila* exposed at pH=7 and pH=4, respectively ($p<0.05$). This parameter shows the probability that an absorbed photon will be captured by antenna molecules of photosystem II and transfer to PSII primary acceptor Q_A for its reduction (Force, Critchley et van Rensen, 2003). Perreault *et al.*, (2011) observed a decrease in the maximal PSII quantum yield in a concentration-dependent manner in *C. reinhardtii* exposed 24 h to Cd

concentrations (0.15 to 4.62 μM). In contrast, our results showed the same tendency for F_v/F_m when cells were exposed to 200, 400 and 600 μM of Cd for both species indicating mechanisms detoxification involved and acclimation of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* grown at pH=7. Also, the exclusion prevented the entry of Cd in *C. acidophila* at low pH, when exposed to the highest Cd concentrations. Our results suggested that Cd induced the inactivation of some PSII reaction centers causing the decrease of PSII electron transport capacity toward PSI, which may be related to the water-splitting system. In a previous work, it was noticed that the water splitting system represented the primary targeted site induced by Cd (Mallick et Mohn, 2003). Our results showed a significant increase of 34% ($p<0.05$) related to control for the ABS/RC ratio in *C. reinhardtii* cells exposed 24 h to 200 μM of Cd. The ABS/RC ratio reflects the total number of photons absorbed by the light-capturing antenna complex per active PSII reaction center (Force, Critchley et van Rensen, 2003). This result indicated a significant decrease of active PSII reaction center in *C. reinhardtii*. A new parameter named performance index (P.I.) was developed having a high sensitivity to stress effect (Stirbet et Govindjee, 2011). In this study, the performance index of PSII (P.I.) for algal cells exposed to 200 μM of Cd showed a significant decrease of 60% ($p<0.05$) relative to the control in *C. reinhardtii*. The alteration of the efficiency of energy transfer from chlorophyll *a* antennae to the PS II reaction center in *Scenedesmus obliquus* was reported under Cd stress (Mallick et Mohn, 2003). They suggested a reduction in the plastoquinone pool causing the decrease of quantum yield (F_v/F_m) under this metal stress. Faller *et al.*, (2005) investigated toxic effects of Cd in *C. reinhardtii* and reported that Cd^{2+} at low concentrations (μM) was an inhibitor of PSII photoactivation, the last step in the assembly of PSII before it becomes functional. They suggested that Cd^{2+} binds competitively to the essential Ca^{2+} site in PSII during photoactivation causing the inhibition of the water splitting system. Indeed, their results showed that the functional PSII has higher selectivity for Ca^{2+} over Cd^{2+} compared to the binding during photoactivation, and consequently Cd^{2+} binding during photoactivation played a more important role than Cd^{2+} binding to functional PSII in photoinhibition. At short time, 0.3 mM of Cd inhibited the photosynthetic activity in *C. reinhardtii* cells while respiration remained highly functional, even after 24 h of exposure (Vega *et al.*, 2006). Our study showed that Cd treatment of 24 h induced an inhibition of photosynthetic capacity of cells independently to concentration by decreasing PSII primary

photochemistry in *C. reinhardtii*. Furthermore, results obtained in this study showed that the performance index (P.I.) had a high sensitivity to Cd physiological stress effect to algal cells. Concerning our results, it appears that the PSII is a more sensitive target in *C. reinhardtii* compared to *C. acidophila* at both pH. Exclusion, as a defense mechanism, did not permitted the entry of Cd ions in *C. acidophila* cells at low pH, and better intracellular detoxification mechanisms were involved in *C. acidophila* compared to *C. reinhardtii* at pH=7, leading to less cellular alterations by Cd.

4.7 Conclusions

Our results obtained in this study demonstrated the advantages and disadvantages regarding the use of green algae *C. reinhardtii* and *C. acidophila* for the removal of heavy metals from the wastewater. Strain *C. acidophila* at pH=7 showed a good capacity for Cd accumulation while the high Cd-resistant of this algal species allowed to tolerate Cd concentrations up to 600 μ M (in the field of studied Cd concentrations) during 72 h. Compared with *C. acidophila*, *C. reinhardtii* at pH=7 presented higher ability to accumulate Cd but low tolerance of this strain against the toxic effects of Cd was limited the time of exposure so that for the highest concentrations tested (400 et 600 μ M), 24 h was the best time of exposure. Considering earlier studies presenting acclimations mechanisms in algae in the presence of metal stress and with the results obtained in the present study, we suggest that the synthesis of phytochelatins in *C. reinhardtii* and the synthesis of stress proteins (Hsps) and glutathione (GSH) in *C. acidophila* at pH=7 and exclusion at low pH is involved as mechanisms of adaptive responses to Cd. At low pH, in the range of studied Cd concentrations and exposed time, the utilization of both strains *Chlamydomonas* for bioremediation applications are not suggested, *C. reinhardtii* because of its lower tolerance and *C. acidophila* due to less intracellular bioaccumulation of Cd. Assuming that *Chlamydomonas* offers a unicellular green alga model with the suitability for genetic analysis (Davies et Grossman, 1998) and the limitations showed by this study in the use of these strains of green algae for bioremediation applications, it is possible to develop the most appropriate strain to provide the possibility of a new bioremediation approach for wastewater treatment.

4.8 Acknowledgments

This research was in part financially supported by the University of Quebec in Montreal (Canada), department of chemistry and faculty of sciences and also by grant awarded to D. Dewez by NSERC individual discovery.

4.9 References

- Abalde, j., A. Cid, S. Reiriz, E. Torres et C. Herrero. 1995. «Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 54, no 2, p. 317-324.
- Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan et I. B. M. Ibraheem. 2012. «Microalgae and wastewater treatment». *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 19, no 3, p. 257-275.
- Aderhold, D., C. J. Williams et R. G. J. Edyvean. 1996. «The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives». *Bioresource Technology*, vol. 58, no 1, p. 1-6.
- Adriano, D. C., N. S. Bolan, J. Vangronsveld et W. W. Wenzel. 2005. «Heavy metals». In *Encyclopedia of Soils in the Environment*, D. Hillel, p. 175-182. Amsterdam: Elsevier.
- Aguilera, A., et R. Amils. 2005. «Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain)». *Aquatic Toxicology*, vol. 75, no 4, p. 316-329. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225936>>.
- Baumann, H. A., L. Morrison et D. B. Stengel. 2009. «Metal accumulation and toxicity measured by PAM--chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no 4, p. 1063-1075. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106005>>.
- Benavides, M. P., S. M. Gallego et M. L. Tomaro. 2005. «Cadmium toxicity in plants». *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 17, no 1, p. 21-34.
- Bernard, A. 2011. «Renal and neurological effects heavy metals in the environment». In *Encyclopedia of Environmental Health*, J. O Nriagu, p. 801-805. Burlington: Elsevier.
- Breeuwer, P., J.L. Drocourt, N. Bunschoten, M.H. Zwietering, F.M. Rombouts et T. Abee. 1995. «Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no 4, p. 1614-1619.

- Das, N., R. Vimala et P. Karthika. 2008. «Biosorption of heavy metals-An overview». *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 7, no 2, p. 159-169.
- Davies, J. P., et A. R. Grossman. 1998. «The use of *Chlamydomonas* (chlorophyta: volvocales) as a model algal system for genome studies and the elucidation of photosynthetic processes». *Journal of Phycology*, vol. 34, no 6, p. 907-917.
- Eccles, H. 1999. «Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?». *Tibtech december*, vol. 17, no 12, p. 462-465.
- Faller, P., K. Kienzler et A. Krieger-Liszkay. 2005. «Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1706, no 1-2, p. 158-164. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620376>>.
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. van Rensen. 2003. «New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants I. the effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test». *Photosynthesis Research*, vol. 78, no 1, p. 17-33.
- Franklin, N. M., M. S. Adams, J. L. Stauber et R. P. Lim. 2001a. «Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 40, no 4, p. 469-480.
- Franklin, N. M., J. L. Stauber et R. P. Lim. 2001b. «Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, no 1, p. 160-170.
- Franqueira, D., M. Orosa, E. Torres, C. Herrero et A. Cid. 2000. «Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae». *The Science of the Total Environment* vol. 247, no 2-3, p. 119-126.
- Gadd, G. M. 2009. «Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects». In *Encyclopedia of microbiology*, Moselio Schaechter, p. 321-334. Oxford: Elsevier.
- Gallego, S. M., L. B. Pena, R. A. Barcia, C. E. Azpilicueta, M. F. Iannone, E. P. Rosales, M. S. Zawoznik, M. D. Groppa et M. P. Benavides. 2012. «Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms». *Environmental and Experimental Botany*, vol. 83, p. 33-46.
- Gerloff-Elias, A., D. Barua, A. Mölich et E. Spijkerman. 2006. «Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 56, no 3, p. 345-354. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689867>>.

- Gimmler, H. 2001b. «Acidophilic and acidotolerant algae». In *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*, L. C. Rai et J. P. Gaur, p. 259-290. Germany: Springer
- Gimmler, H., J. Jesus et A. Greiser. 2001a. «Heavy metal resistance of the extreme acidotolerant filamentous fungus *Bispora* sp». *Microbial ecology*, vol. 42, no 1, p. 87-98. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035084>>.
- Gimmler, H., B. Treffny, M. Kowalski et U. Zimmermann. 1991. «The resistance of *Dunaliella acidophila* against heavy metals: the importance of the zeta potential». *Journal of Plant Physiology*, vol. 138, no 6, p. 708-716.
- Hanikenne, M. 2003. «*Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance». *New Phytologist*, vol. 159, no 2, p. 331-340.
- Harris, E. H. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego: Academic Press, 780 p.
- Harris, E. H. 2001. «*Chlamydomonas* as a model organism». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 52, p. 363-406.
- Jamers, A., M. Lenjou, P. Deraedt, D. V. Bockstaele, R. Blust et W. de Coen. 2009. «Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)». *European Journal of Phycology*, vol. 44, no 4, p. 541-550.
- Juneau, P., A. El Berdey et R. Popovic. 2002. «PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 42, no 2, p. 155-164.
- Macfie, S. M., Y Tarmohamed et P. M. Welbourn. 1994. «Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH». *Archives of Environmental Contamination and toxicology* vol. 27, no 4, p. 454-458.
- Mallick, N., et F. H. Mohn. 2003. «Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 55, no 1, p. 64-69..
- Muñoz, R., M. Jacinto, B. Guieysse et B. Mattiasson. 2005. «Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial bioreactors». *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 67, no 5, p. 699-707. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666149>>.

- Nassiri, Y., J. L. Mansot, J. Wéry, T. Ginsburger-Vogel et J. C. Amiard. 1997. «Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 33, no 2, p. 147-155.
- Nishikawa, K., A. Onodera et N. Tominaga. 2006. «Phytochelatin do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp». *Chemosphere*, vol. 63, no 9, p. 1553-1559. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297961>>.
- Nishikawa, K., et N. Tominaga. 2001. «Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green Alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 65, no 12, p. 2650-2656.
- Nishikawa, K., Y. Yamakoshi, I. Uemura et N. Tominaga. 2003. «Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 44, no 2, p. 253-259.
- Okamoto, O. K., C. S. Asano, E. Aida et P. Colepicolo. 1996. «Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (prasinophyceae)». *Journal of Phycology*, vol. 32, p. 74-79.
- Olaveson, M. M., et P. M. Stokes. 1989. «Responses of the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3». *Journal of Phycology*, vol. 25, p. 529-539.
- Parent, L., et P. G. C. Campbell. 1994. «Aluminum bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, no 4, p. 587-598.
- Perreault, F., D. Dewez, C. Fortin, P. Juneau, A. Diallo et R. Popovic. 2010. «Effect of aluminum on cellular division and photosynthetic electron transport in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas acidophila*». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 29, no 4, p. 887-892. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20821518>>.
- Perreault, F., J. Dionne, O. Didur, P. Juneau et R. Popovic. 2011. «Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II». *Photosynthesis Research*, vol. 107, no 2, p. 151-157. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188526>>.
- Prasad, M. N. V., K. Drej, A. Skawinska et K. Straika. 1998. «Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15)». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 60, no 2, p. 306-311.

- Rioboo, C., O. González, C. Herrero et A. Cid. 2002. «Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides». *Aquatic Toxicology*, vol. 59, no 3-4, p. 225-235.
- Sanità di Toppi, L., et R. Gabbrielli. 1999. «Response to cadmium in higher plants». *Environmental and Experimental Botany* vol. 41, no 2, p. 105-130.
- Sheng, P. X., Y. P. Ting, J. P. Chen et L. Hong. 2004. «Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 275, no 1, p. 131-141. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158390>>.
- Spijkerman, E., D. Barua, A. Gerloff-Elias, J. Kern, U. Gaedke et S. A. Heckathorn. 2007. «Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium». *Extremophiles*, vol. 11, no 4, p. 551-562. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429574>>.
- Stirbet, A., et Govindjee. 2011. «On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 104, no 1-2, p. 236-257. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295993>>.
- Strasser, R. J., M. Tsimilli-Michael et A. Srivastava. 2004. «Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient». In *Chlorophyll Fluorescence: a signature of photosynthesis*, G. C. Papageorgiou et Govindjee, p. 321-362. Dordrecht: Springer.
- Vega, J. M., I. Garbayo, M. J. Domínguez et J. Vígara. 2006. «Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*, induction of oxidative stress». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no 1, p. 163-167.
- Visviki, I., et J.W. Rachlin. 1994. «Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on ultrastructure». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 26, no 2, p. 154-162.
- Wang, X. D., X. J. Liu, S. Yang, A. L. Li et Y. L. Yang. 2007. «Removal and toxicological response of Triazophos by *Chlamydomonas reinhardtii*». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 78, no 1, p. 67-71. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372659>>.
- Zhang, S., C. B. Qiu, Y. Zhou, Z. P. Jin et H. Yang. 2011. «Bioaccumulation and degradation of pesticide fluroxypyr are associated with toxic tolerance in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*». *Ecotoxicology*, vol. 20, no 2, p. 337-347. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153053>>.

Table 4.1 Cadmium speciation (%) in HSM and MAM culture medium at 25°C using the chemical equilibrium calculation (Visual MINTEQ 2.61).

pH= 7		[Cd] μ M				
Species	50	100	200	400	600	
Cd ²⁺	12,35%	12,38%	12,44%	12,55%	12,66%	
CdCl ⁺	5,59%	5,66%	5,81%	6,08%	6,36%	
CdCl ₂	0,16%	0,16%	0,17%	0,18%	0,20%	
CdSO ₄	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%	
CdNH ₃ ²⁺	0,125%	0,125%	0,126%	0,127%	0,128%	
CdHPO ₄	81,40%	81,38%	81,26%	80,92%	80,54%	
CdEDTA ⁻²	0,35%	0,26%	0,18%	0,11%	0,08%	

pH= 4		[Cd] μ M				
Species	50	100	200	400	600	
Cd ²⁺	33,14%	50,63%	59,32%	63,24%	64,15%	
CdCl ⁺	1,39%	2,39%	3,42	4,95%	6,32%	
CdSO ₄	12,71%	19,33%	22,44%	23,50%	23,42%	
Cd(SO ₄) ₂ ⁻²	0,86%	1,31%	1,51%	1,57%	1,55%	
CdHPO ₄	0,06%	0,09%	0,10%	0,11%	0,11%	
CdEDTA ⁻²	40,37%	20,45%	10,29%	5,16%	3,45%	
CdHEDTA ⁻	11,35%	5,75%	2,89%	1,44%	0,96%	
CdH ₂ EDTA	0,12%	0,06%	0,03%	0,02%	0,01%	
CdCl ₂	0.0%	0.0%	0,01%	0,02%	0,04%	

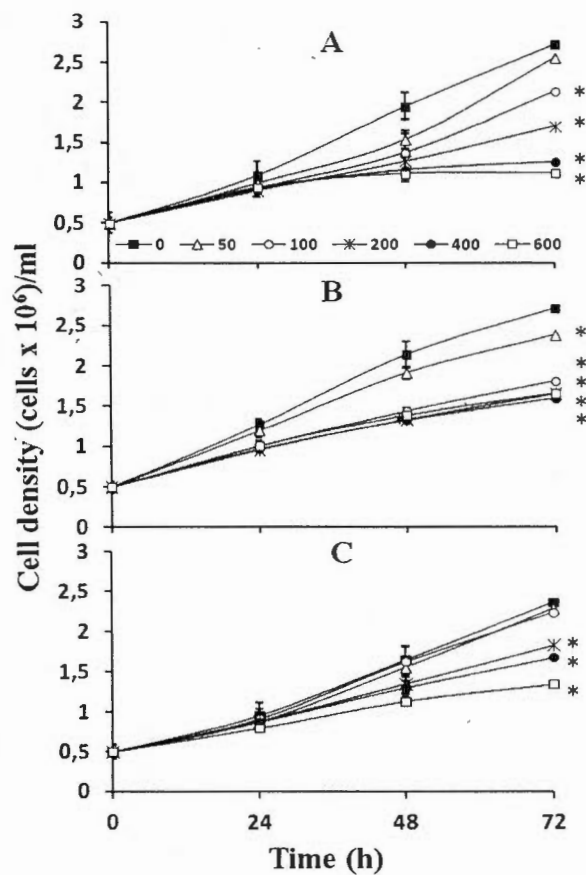


Figure 4.1 Change in cell density of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* at pH=7, and (C) shows change in cell density of *C. acidophila* at pH=4. Error bars are the standard deviation of four replicate algal cultures. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).

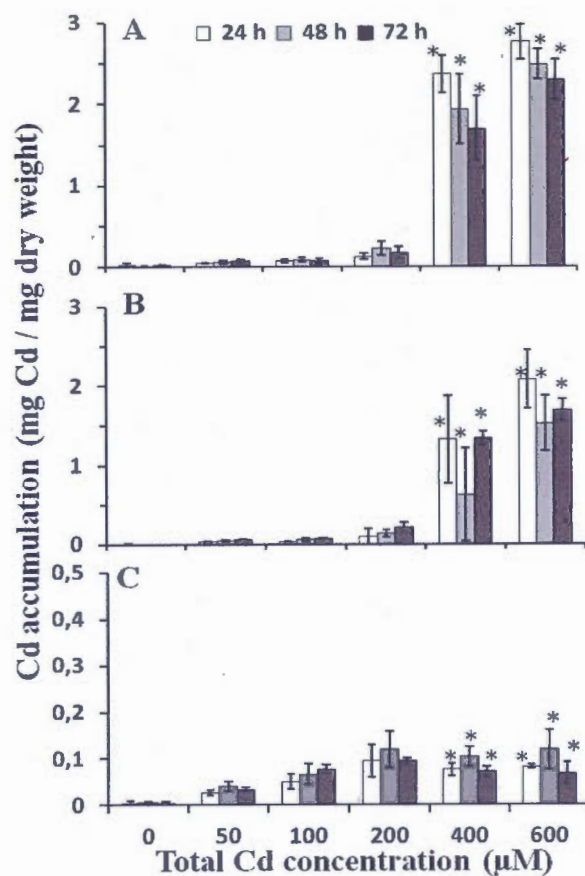


Figure 4.2 Intracellular Cd accumulation in *C. reinhardtii* and *C. acidophila* exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* at pH=7, and (C) shows intracellular Cd accumulation in *C. acidophila* at pH=4. Error bars are the standard deviation of four replicate algal cultures. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).

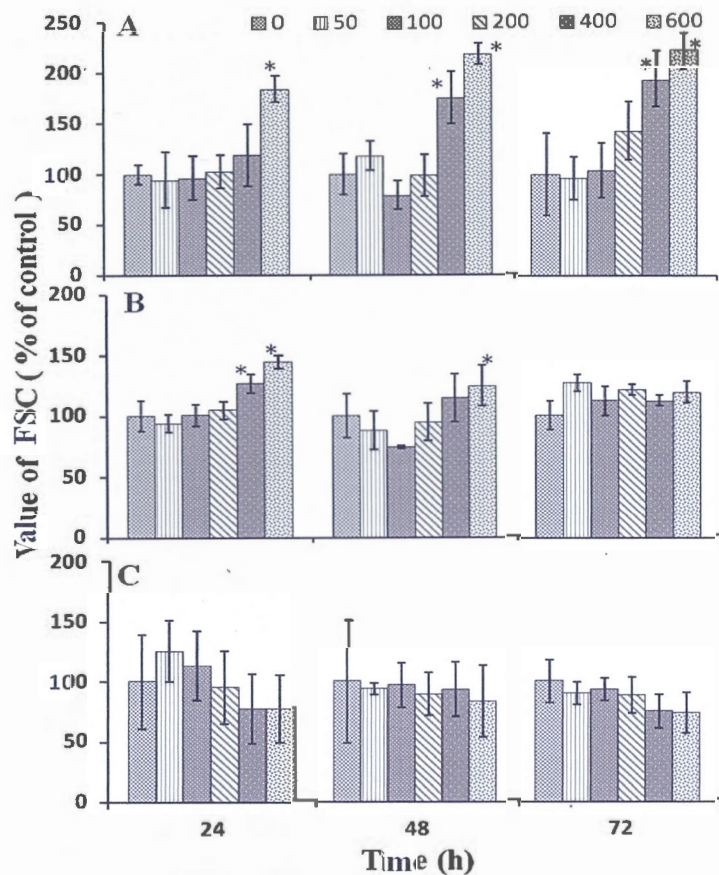


Figure 4.3 Change in cell size of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μ M) and pH, evaluated by scattered light; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* at pH=7 and (C) shows change in cell size of *C. acidophila* at pH=4. Error bars are the standard deviation of eight measurements. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).

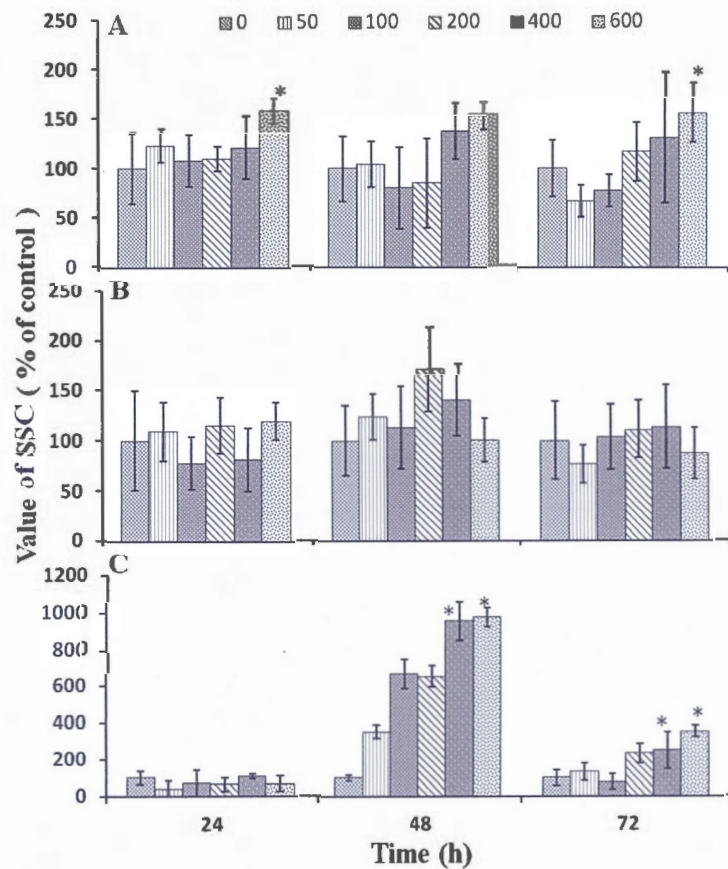


Figure 4.4 Change in cell granularity of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μ M) and pH, evaluated by scattered light; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* at pH=7 and (C) shows change in cell granularity of *C. acidophila* at pH=4. Error bars are the standard deviation of eight measurements. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).

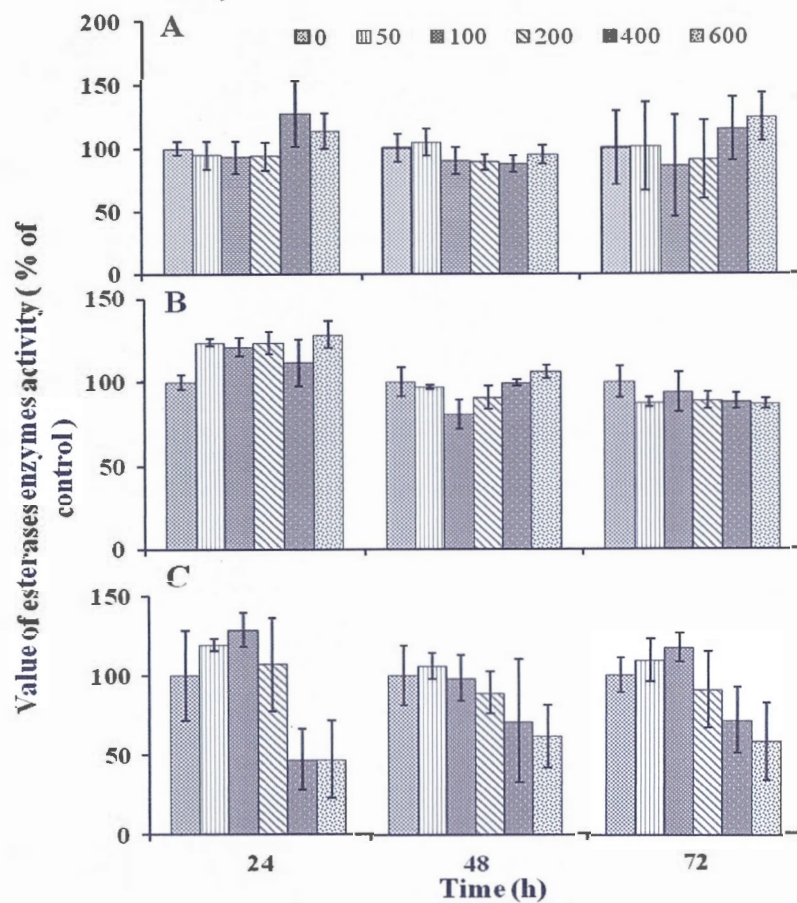


Figure 4.5 Change in esterases enzymes activity of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* exposed during 72 h to different concentrations of Cd (μM) and pH, evaluated by Fluorescein fluorescence; (A) and (B) show respectively differences between exposed cultures of *C. reinhardtii* and *C. acidophila* at pH=7, and (C) shows change in esterases enzymes activity of *C. acidophila* at pH=4. Error bars are the standard deviation of eight measurements.

Table 4.2 Photosynthetic-based fluorescence parameters of algal cells exposed 24 h to different concentrations of Cd and pH. Data represent the average of four measurements. Stars indicate significant differences with the control at a significance level of 0.05 ($p < 0.05$).

[Cd ²⁺] μ M	<i>C. reinhardtii</i> (pH = 7)			
	Φ_{PO}	V_J	ABS/RC	PI
0	0.72 \pm 0.009	0.49 \pm 0.01	2.87 \pm 0.015	0.86 \pm 0.014
200	* 0.67 \pm 0.001	0.59 \pm 0.007	* 3.86 \pm 0.087	* 0.35 \pm 0.015
400	* 0.66 \pm 0.007	0.59 \pm 0.01	* 4.04 \pm 0.167	* 0.31 \pm 0.028
600	* 0.69 \pm 0.006	0.60 \pm 0.008	* 3.80 \pm 0.108	* 0.36 \pm 0.014
[Cd ²⁺] μ M	<i>C. acidophila</i> (pH = 7)			
	Φ_{PO}	V_J	ABS/RC	PI
0	0.73 \pm 0.002	0.52 \pm 0.014	2.96 \pm 0.189	0.78 \pm 0.094
200	* 0.70 \pm 0.003	0.55 \pm 0.004	3.02 \pm 0.021	* 0.58 \pm 0.008
400	* 0.70 \pm 0.003	0.55 \pm 0.021	3.12 \pm 0.219	* 0.57 \pm 0.094
600	* 0.69 \pm 0.002	0.56 \pm 0.003	3.18 \pm 0.108	* 0.51 \pm 0.021
[Cd ²⁺] μ M	<i>C. acidophila</i> (pH = 4)			
	Φ_{PO}	V_J	ABS/RC	PI
0	0.63 \pm 0.005	0.58 \pm 0.01	3.54 \pm 0.102	0.32 \pm 0.026
200	* 0.60 \pm 0.004	0.59 \pm 0.008	3.72 \pm 0.069	* 0.27 \pm 0.013
400	* 0.60 \pm 0.001	0.59 \pm 0.007	* 3.76 \pm 0.054	* 0.26 \pm 0.011
600	* 0.58 \pm 0.006	0.60 \pm 0.008	* 3.99 \pm 0.148	* 0.22 \pm 0.018

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans ce travail, les effets de l'accumulation intracellulaire du cadmium, un métal toxique, ont été étudiés chez deux espèces d'algues vertes, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas acidophila*, dans le but de déterminer leurs avantages et désavantages pour une application d'assainissement des eaux usées contaminées aux métaux. *Chlamydomonas*, une algue verte unicellulaire est connue comme un organisme modèle qui possède un cycle de vie simple (Harris, 2001). En plus, la transformation du génome est facile et introduire l'ADN est possible, soit dans le noyau, soit dans le génome chloroplastique (Davies et Grossman, 1998) pour l'amélioration des espèces d'algues dans une perspective d'application d'assainissement des eaux usées. La disponibilité d'un métal dans le milieu acide est plus élevée. Donc, dans cette condition, l'absorption du Cd chez *C. acidophila*, sa capacité d'accumuler le Cd et sa tolérance contre les effets toxiques de Cd ont été analysées. Il faut noter que *C. reinhardtii* ne peut pas croître à faible pH et l'utilisation de *C. acidophila*, un organisme métal-résistant n'a pas été encore évaluée pour une application d'assainissement des eaux polluées.

Dans cette recherche, la biomasse de *C. acidophila* à pH 4 a accumulé moins de Cd que celle de *C. acidophila* et *C. reinhardtii* à pH 7. Les résultats obtenus à pH 7 indiquent une accumulation plus élevée de Cd chez *C. reinhardtii* par rapport à *C. acidophila* montrant que l'algue *C. acidophila* présente de meilleurs mécanismes de protection cellulaire en limitant l'absorption du Cd dans la cellule. Nous avons supposé que probablement *C. acidophila* possède une paroi cellulaire qui permet de limiter l'absorption de Cd dans la cellule.

Les résultats du changement de la densité cellulaire à pH 7 montrent qu'aux concentrations plus élevées de Cd (400 et 600 μM) la division cellulaire de *C. acidophila* est moins inhibée que celle de *C. reinhardtii* indiquant que *C. acidophila* possède une tolérance plus élevée par rapport à *C. reinhardtii* en présence des ions toxiques de Cd. Une tendance

similaire pour *C. acidophila* traitée au Cd sous deux différents pH (4 et 7) a prouvé aucune relation entre le changement du pH et la division cellulaire. En comparant l'accumulation cellulaire de *C. acidophila* à pH 7 par rapport à pH 4, nous n'avons pas observé une différence significative dans la division cellulaire lors d'une exposition à 600 μM de Cd. Bien que la bioaccumulation soit plus élevée à pH 7, le Cd intracellulaire n'a pas causé une plus grande inhibition de la division cellulaire.

Pour sélectionner l'espèce la plus appropriée dans le but d'éliminer les ions métalliques du milieu, la capacité d'accumulation de l'espèce et sa tolérance contre les effets toxiques doivent être étudiées. Les résultats obtenus par la fluorescence chlorophyllienne peuvent confirmer que la concentration de 200 μM de Cd est la concentration maximale que *C. reinhardtii* peut tolérer pendant 72 h d'exposition. Concernant les changements à 24 h de tous les paramètres photosynthétiques comme Φ_{PO} , ABS/RC et P.I., nous n'avons pas observé une différence significative entre 200 μM et les concentrations de 400 et 600 chez *C. reinhardtii*. Ce qui confirme que 24 h est le temps maximal que cette espèce peut tolérer la concentration de 600 μM de Cd. L'accumulation de Cd chez ces deux espèces à pH 7 atteint le maximum lors d'une exposition à 600 μM de Cd après 24 h, mais les changements des paramètres de fluorescence montrent que l'activité photosynthétique chez *C. reinhardtii* est plus altérée que *C. acidophila*. En fait, le PSII a été considéré comme une cible plus sensible à l'action toxique du Cd chez *C. reinhardtii*. Considérant les résultats de l'inhibition cellulaire et ceux obtenus par la fluorescence chlorophyllienne à 72 h d'exposition, *C. acidophila* à pH 7 peut tolérer une concentration de Cd jusqu'à 600 μM pendant 72 h. Notre étude montre aussi que l'indice de performance du PSII (P.I.) est un paramètre sensible et fiable des effets toxiques cellulaires causés par le Cd.

Les changements de la taille et de la granulosité des cellules de *C. reinhardtii* confirment l'altération cellulaire d'une exposition de 72 h aux concentrations plus élevées de Cd (400 et 600 μM). Nous avons proposé que l'augmentation de la taille et de la granulosité des cellules de *C. reinhardtii* peut être liée à l'inhibition de la division cellulaire et aux dommages cellulaires. En plus, les études précédentes ont montré que les microorganismes présentaient des changements ultrastructuraux en réponse au stress métallique tels que les vacuolisations cytoplasmiques, le développement des organites membraneux, l'accumulation

des lipides, l'accumulation de l'amidon et l'accumulation cytoplasmique de granules qui peuvent être reflétés dans les signaux de SSC montrant une augmentation de la granulosité cellulaire. Malgré l'accumulation plus élevée de Cd chez *C. acidophila* à pH 7 par rapport à pH 4, aucune altération cellulaire correspondant au changement de la taille cellulaire n'a été observée sous les deux conditions de pH et lors de l'exposition de Cd pendant 72 h confirmant l'implication des mécanismes de protections intracellulaires chez cette espèce. Comme les résultats obtenus pour la taille des cellules de *C. acidophila* à pH 7 exposées au Cd pendant 72 h, aucune différence significative n'a été observée chez la granulosité des cellules de cette espèce par rapport au témoin, mais à pH 4, nous avons observé qu'une tendance différente représentant une grande augmentation par rapport au témoin dans la granulosité des cellules de *C. acidophila* exposées aux concentrations de 400 et 600 μM après 48 h, de sorte que cette augmentation a été aussi manifestée après 72 h mais à un pourcentage moins élevé par rapport à 48 h. Considérant les résultats de l'accumulation intracellulaire, la biomasse de *C. acidophila* à pH 4 a moins accumulée de Cd. Par conséquent, nous avons supposé que l'exclusion a été probablement une cause. De plus, l'accumulation de Cd pouvait être contrôlée par la paroi cellulaire, le periplasmalemma (l'espace entre la paroi cellulaire et la membrane cellulaire) et la membrane plasmique. En conséquence, les débris cellulaires sont responsables de l'augmentation significative des signaux de SSC. Après 72 h, les mécanismes d'acclimatation cellulaire ont permis la survie de *C. acidophila* sous de telles conditions.

Au contraire de l'accumulation de Cd chez les deux espèces d'algue à pH 7, la fluorescence de la Fluorescéine émise de *C. reinhardtii* et *C. acidophila* pendant 72 h d'exposition n'a pas changé. Ces résultats sont plus intéressants chez *C. reinhardtii*, malgré la capacité plus élevée d'accumuler le Cd, une plus grande sensibilité de cette espèce à l'effet toxique de Cd concernant l'inhibition de la division cellulaire, la diminution de l'activité photosynthétique et les altérations de la morphologie cellulaire lors de l'exposition aux concentrations plus élevée de Cd. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'intensité de la Fluorescéine chez ces deux espèces à pH 7. D'après les travaux antérieurs, nous avons supposé que l'activité des enzymes estérases reste élevée, car elles participent à la détoxification du Cd.

La fluorescence de la Fluorescéine montre les deux paramètres, la perméabilité de la membrane cellulaire et l'activité des enzymes estérases (Franklin *et al.*, 2001a). Les résultats obtenus à pH 4 indiquent aucune différence significative dans les résultats de la fluorescence de Fluorescéine (FDA) par rapport au témoin pendant 72 h d'exposition à 400 et 600 μM de Cd. Nous avons supposé que l'exclusion peut être causée une accumulation moins élevée de Cd et donc aucune différence significative dans l'activité enzymatique des estérases à faible pH. En plus, il est possible que l'exclusion et les dommages aux membranes aient empêché la molécule de FDA de passer à l'intérieur de la cellule, car la FDA peut passer seulement à travers les membranes cellulaires viables et donc aucune différence significative dans la fluorescence de la Fluorescéine à faible pH. Par ailleurs, concernant l'inhibition de la division cellulaire de cette espèce lors de l'exposition aux concentrations plus élevée de Cd, les résultats de la fluorescence de Fluorescéine indiquent la participation des enzymes estérases à la détoxification du Cd. Donc, notre étude confirme que la mesure de la granulosité cellulaire est un bon biomarqueur pour vérifier les effets toxiques en dehors du cytosol cellulaire.

Donc, les résultats obtenus dans cette recherche ont présenté les avantages et les désavantages concernant l'application des deux espèces dans une approche d'assainissement des eaux usées. L'espèce *C. acidophila* à pH 7 a montré une bonne capacité d'accumulation de Cd, tandis que la forte tolérance de cette espèce a permis l'accumulation d'une concentration de Cd jusqu'à 600 μM pendant 72 h. D'autre part, *C. reinhardtii* à pH 7 possède une capacité plus élevée de bioaccumuler le Cd, mais sa faible tolérance contre les effets toxiques de Cd est limitée par le temps d'exposition. Pour les concentrations élevées (400 et 600 μM), 24 h était le meilleur temps d'exposition que cette espèce pouvait tolérer. En considérant les mécanismes d'acclimations présentés par les études précédentes chez les algues en présence des métaux, la synthèse des phytochélatines, la synthèse des protéines de stress (Hsps) et du glutathion (GSH) pourraient être suggérer comme des mécanismes de réponses envers le Cd. À faible pH, dans l'intervalle des concentrations de Cd et de temps étudiés, les deux espèces de *Chlamydomonas* ne sont pas suggérées pour les applications de bioremediation, *C. reinhardtii* en raison de sa tolérance moins élevée et *C. acidophila* en raison de sa capacité d'accumulation moins élevée. Par conséquent, cette étude indique les

limites pour l'utilisation de ces deux espèces d'algues vertes dans une application de bioremédiation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abalde, j., A. Cid, S. Reiriz, E. Torres et C. Herrero. 1995. «Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 54, no 2, p. 317-324.
- Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan et I. B. M. Ibraheem. 2012. «Microalgae and wastewater treatment». *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 19, no 3, p. 257-275.
- Aderhold, D., C. J. Williams et R. G. J. Edyvean. 1996. «The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives». *Bioresource Technology*, vol. 58, no 1, p. 1-6.
- Adriano, D. C. , N. S. Bolan, J. Vangronsveld et W. W. Wenzel. 2005. «Heavy metals». In *Encyclopedia of Soils in the Environment*, D. Hillel, p. 175-182. Amsterdam: Elsevier.
- Aguilera, A., et R. Amils. 2005. «Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain)». *Aquatic Toxicology*, vol. 75, no 4, p. 316-329. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225936>>.
- Arsenault, G., A. D. Cvetkovic et R. Popovic. 1993. «Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry based method». *Water Pollution Research Journal of Canada*, vol. 28, no 4, p. 757-765.
- Baker, N. R. 2008. «Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo». *Annual Review of Plant Biology*, vol. 59, p. 89-113. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444897>>.
- Barter, L. M. C., D. R. Klug et R. Van Grondelle. 2005. «Energy trapping and equilibration: a balance of regulation and efficiency». In *Photosystem II. the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase*, T. J. Wydrzynski et K. Satoh, p. 491-514. Dordrecht: Springer.

- Baumann, H. A., L. Morrison et D. B. Stengel. 2009. «Metal accumulation and toxicity measured by PAM--chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no 4, p. 1063-1075. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106005>>.
- Benavides, M. P., S. M. Gallego et M. L. Tomaro. 2005. «Cadmium toxicity in plants». *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 17, no 1, p. 21-34.
- Bernard, A. 2011. «Renal and neurological effects heavy metals in the environment». In *Encyclopedia of Environmental Health*, J. O Nriagu, p. 801-805. Burlington: Elsevier.
- Borowitzka, M. A. 1999. «Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters». *Journal of Biotechnology* vol. 70, no 1-3, p. 313-321.
- Brack, A., et P. Mathis. 2000. *La chimie du vivant de la protéine à la photosynthèse a Quatre/ Quatre: Le Pommier* 157 p.
- Breeuwer, P., J.L. Drocourt, N. Bunschoten, M.H. Zwietering, F.M. Rombouts et T. Abee. 1995. «Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no 4, p. 1614-1619.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem et R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Maryland : Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1367 p.
- Clemens, S. 2001. «Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis». *Planta*, vol. 212, no 4, p. 475-486.
- Collard, J-M., et R. F. Matagne. 1990. «Isolation and genetic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* strains resistant to cadmium». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, no 7, p. 2051-2055.
- Cruz, B. H., J. M. Díaz-Cruz, I. Šestáková, J. Velek, C. Ariño et M. Esteban. 2002. «Differential pulse voltammetric study of the complexation of Cd(II) by the phytochelatin (γ -Glu-Cys)₂Gly assisted by multivariate curve resolution». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 520, no 1, p. 111-118.

- Das, N., R. Vimala et P. Karthika. 2008. «Biosorption of heavy metals-An overview». *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 7, no 2, p. 159-169.
- Davies, J. P., et A. R. Grossman. 1998. «The use of *Chlamydomonas* (chlorophyta: volvocales) as a model algal system for genome studies and the elucidation of photosynthetic processes». *Journal of Phycology*, vol. 34, no 6, p. 907-917.
- Dent, R. M., M. Han et K. K. Niyogi. 2001. «Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*». *TRENDS in Plant Science*, vol. 6, no 8, p. 364-371.
- Eccles, H. 1995. «Removal of heavy metals from effluent streams why select a biological process?». *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 35, no 1-3, p. 5-16.
- Eccles, H. 1999. «Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?». *Tibtech december*, vol. 17, no 12, p. 462-465.
- Fabiani, C. 1992. «Recovery of metal ions from waters and sludges». *ENEA [rapporti tecnici] RT/AMB/92/32*.
- Faller, P., K. Kienzler et A. Krieger-Liszkay. 2005. «Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1706, no 1-2, p. 158-164. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620376>>.
- Farineau, J., et J-F. Morot-Gaudry. 2006. *La photosynthèse, processus physiques, moléculaires et physiologiques*. Paris: INRA, 403 p.
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. van Rensen. 2003. «New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants 1. the effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test». *Photosynthesis Research*, vol. 78, no 1, p. 17-33.

- Franklin, N. M., M. S. Adams, J. L. Stauber et R. P. Lim. 2001a. «Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 40, no 4, p. 469-480.
- Franklin, N. M., J. L. Stauber et R. P. Lim. 2001b. «Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, no 1, p. 160-170.
- Franqueira, D., M. Orosa, E. Torres, C. Herrero et A. Cid. 2000. «Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae». *The Science of the Total Environment* vol. 247, no 2-3, p. 119-126.
- Gadd, G. M. 2009. «Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects». In *Encyclopedia of microbiology*, Moselio Schaechter, p. 321-334. Oxford: Elsevier.
- Gallego, S. M., L. B. Pena, R. A. Barcia, C. E. Azpilicueta, M. F. Iannone, E. P. Rosales, M. S. Zawoznik, M. D. Groppa et M. P. Benavides. 2012. «Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms». *Environmental and Experimental Botany*, vol. 83, p. 33-46.
- Gerloff-Elias, A., D. Barua, A. Mölich et E. Spijkerman. 2006. «Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 56, no 3, p. 345-354. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689867>>.
- Gimmler, H. 2001b. «Acidophilic and acidotolerant algae». In *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*, L. C. Rai et J. P. Gaur, p. 259-290. Germany: Springer
- Gimmler, H., J. Jesus et A. Greiser. 2001a. «Heavy metal resistance of the extreme acidotolerant filamentous fungus *Bispora* sp». *Microbial ecology*, vol. 42, no I, p. 87-98. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035084>>.
- Gimmler, H., B. Treffny, M. Kowalski et U. Zimmermann. 1991. «The resistance of *Dunaliella acidophila* against heavy metals: the importance of the zeta potential». *Journal of Plant Physiology*, vol. 138, no 6, p. 708-716.

- Govindjee, et W. Coleman. 1990. «How plants make oxygen». *Scientific American*, vol. 262, no 2, p. 50-58.
- Govindjee, J. F. Kern, J. Messinger et J. Whitmarsh. 2010. «Photosystem II». In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, J. Wiley et S. Ltd.
- Grill, E., S. Löffler, E-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1989. «Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no 18, p. 6838-6842.
- Grill, E., E-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1987. «Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, p. 439-443.
- Grill, E., E-L. Winnacker et M. H. Zenk. 1985. «Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants». *Science*, vol. 230, no 4726, p. 674-676.
- Hanikenne, M. 2003. «*Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance». *New Phytologist*, vol. 159, no 2, p. 331-340.
- Harris, E. H. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego: Academic Press, 780 p.
- Harris, E. H. 2001. «*Chlamydomonas* as a model organism». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 52, p. 363-406.
- Hartl, F. U. 1996. «Molecular chaperones in cellular protein folding ». *Nature*, vol. 381, no 6583, p. 571-579.
- Howe, G., et S. Merchant. 1992. «Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*». *Plant Physiology*, vol. 98, no 1, p. 127-136.

- Hu, S., K. W. K. Lau et M. Wu. 2001. «Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*». *Plant Science* vol. 161, no 5, p. 987-996.
- Jamers, A., M. Lenjou, P. Deraedt, D. V. Bockstaele, R. Blust et W. de Coen. 2009. «Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)». *European Journal of Phycology*, vol. 44, no 4, p. 541-550.
- Järup, L. 2003. «Hazards of heavy metal contamination». *British Medical Bulletin*, vol. 68, no 1, p. 167-182.
- Juneau, P., A. El Berdey et R. Popovic. 2002. «PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 42, no 2, p. 155-164.
- Jupin, H., et A. Lamant. 1999. *La photosynthèse*. Paris: Dunod, 268 p.
- Kobayashi, R., et E. Yoshimura. 2006. «Differences in the binding modes of phytochelatin to cadmium(II) and zinc(II) ions». *Biological Trace Element Research*, vol. 114, no 1-3, p. 313-318.
- Kok, B., B. Forbush et M. McGloin. 1970. «Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution- I. a linear four step mechanism». *Photochemistry and Photobiology*, vol. 11, no 6, p. 457-475.
- Küpper, H., F. Küpper et M. Spiller. 1996. «Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants». *Journal of Experimental Botany*, vol. 47, no 295, p. 259-266.
- Lagadic, L., T. Caquet, J-C. Amiard et F. Ramade. 1998. *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. New York: Technique & Documentation, 356 p.
- Laksanalamai, P., et F. T. Robb. 2004. «Small heat shock proteins from extremophiles: a review». *Extremophiles*, vol. 8, no 1, p. 1-11. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064984>>.

- Lavoie, M., S. L. Faucheur, C. Fortin et P. G. C. Campbell. 2009. «Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules». *Aquatic Toxicology*, vol. 92, no 2, p. 65-75. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201040>>.
- Lazár, D. 1999. «Chlorophyll *a* fluorescence induction». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1412, no 1, p. 1-28.
- Lazár, D. 2006. «The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light». *Functional Plant Biology*, vol. 33, no 1, p. 9.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. «Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes». *Methods in enzymology*, vol. 148, p. 350-383.
- Lubitz, W., E. J. Reijerse et J. Messinger. 2008. «Solar water-splitting into H₂ and O₂: design principles of photosystem II and hydrogenases». *Energy & Environmental Science*, vol. 1, no 1, p. 15-31.
- Macfie, S. M., Y Tarmohamed et P. M. Welbourn. 1994. «Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH». *Archives of Environmental Contamination and toxicology* vol. 27, no 4, p. 454-458.
- Macfie, S. M., et P. M. Welbourn. 2000. «The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 39, no 4, p. 413-419. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031300>>.
- Malkin, R, et M Niyogi. 2000. «Photosynthesis». In *Biochemistry and molecular biology of plants*, B. B Buchanan, W Grissem et R. L Jones, p. 568-628. Maryland : Rockville: American Society of Plant Physiologists. .
- Mallick, N., et F. H. Mohn. 2003. «Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 55, no 1, p. 64-69.

- Martín-González, A., S. Díaz, S. Borniquel, A. Gallego et J. C. Gutiérrez. 2006. «Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants». *Research in Microbiology*, vol. 157, no 2, p. 108-118. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16129584>>.
- Mason, A. Z., et K. D. Jenkins. 1995. «Metal detoxification in aquatic organisms». In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier et D. R. Turner, p. 479-608. New York, NY, USA: JohnWiley.
- Mathis, P., et G. Paillotin. 1981. «Primary processes of photosynthesis». In *The biochemistry of plants*, M. D. Hatch et N. K. Boardman, p. 97-161. New York: Academic Press.
- Mendez-Alvarez, S., U. Leisinger et R. I. L. Eggen. 1999. «Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*». *International Microbiology*, vol. 2, no 1, p. 15-22.
- Müller, P., X-P. Li et K. K. Niyogi. 2001. «Non-photochemical quenching. a response to excess light energy». *Plant Physiology*, vol. 125, no 4, p. 1558-1566.
- Muñoz, R., et B. Guieysse. 2006. «Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review». *Water Research*, vol. 40, no 15, p. 2799-2815. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889814>>.
- Muñoz, R., M. Jacinto, B. Guieysse et B. Mattiasson. 2005. «Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial bioreactors». *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 67, no 5, p. 699-707. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666149>>.
- Mustárdy, L., et G. Garab. 2003. «Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place». *TRENDS in Plant Science*, vol. 8, no 3, p. 117-122.
- Nassiri, Y., J. L. Mansot, J. Wéry, T. Ginsburger-Vogel et J. C. Amiard. 1997. «Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 33, no 2, p. 147-155.

- Neubauer, C., et U. Schreiber. 1987. «The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination : 1. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side». *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 42, p. 1246-1254.
- Nishikawa, K., A. Onodera et N. Tominaga. 2006. «Phytochelatin do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas spp*». *Chemosphere*, vol. 63, no 9, p. 1553-1559. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297961>>.
- Nishikawa, K., et N. Tominaga. 2001. «Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green Alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 65, no 12, p. 2650-2656.
- Nishikawa, K., Y. Yamakoshi, I. Uemura et N. Tominaga. 2003. «Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 44, no 2, p. 253-259.
- Okamoto, O. K., C. S. Asano, E. Aida et P. Colepicolo. 1996. «Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (prasinophyceae)». *Journal of Phycology*, vol. 32, p. 74-79.
- Olaveson, M. M., et P. M. Stokes. 1989. «Responses of the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3». *Journal of Phycology*, vol. 25, p. 529-539.
- Pal, R., et J. P. N. Rai. 2010. «Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification». *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 160, no 3, p. 945-963. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224399>>.
- Papageorgiou, G., et Govindjee. 2004. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Coll. «Advances in Photosynthesis and Respiration», no 19. Dordrecht: Springer, 820 p.
- Parent, L., et P. G. C. Campbell. 1994. «Aluminum bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, no 4, p. 587-598.

- Perreault, F., D. Dewez, C. Fortin, P. Juneau, A. Diallo et R. Popovic. 2010. «Effect of aluminum on cellular division and photosynthetic electron transport in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas acidophila*». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 29, no 4, p. 887-892. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20821518>>.
- Perreault, F., J. Dionne, O. Didur, P. Juneau et R. Popovic. 2011. «Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II». *Photosynthesis Research*, vol. 107, no 2, p. 151-157. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188526>>.
- Prasad, M. N. V., K. Drej, A. Skawinska et K. Stratka. 1998. «Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15)». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 60, no 2, p. 306-311.
- Pulz, O. 2001. «Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms». *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no 3, p. 287-293.
- Rausser, W. E. 1995. «Phytochelatins and related peptides structure, biosynthesis, and function». *Plant Physiology*, vol. 109, no 4, p. 1141-1149.
- Remis, D., W. Simonis et H. Gimmmler. 1992. «Measurement of the transmembrane electrical potential of *Dunaliella acidophila* by microelectrodes». *Archives of Microbiology*, vol. 158, no 5, p. 350-355.
- Renger, G., et A. R. Holzwarth. 2005. «Primary electron transfer». In *Photosystem II. the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase*, T. Wydrzynski et K. Satoh, p. 139. Dordrecht: Springer.
- Richmond, A. 2004. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Wiley-Blackwell, 566 p.
- Rioboo, C., O. González, C. Herrero et A. Cid. 2002. «Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides». *Aquatic Toxicology*, vol. 59, no 3-4, p. 225-235.

- Rivas, J. D. L., M. Balsera et J. Barber. 2004. «Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins». *TRENDS in Plant Science*, vol. 9, no 1, p. 18-25. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729215>>.
- Rochaix, J. D. 1995. «*Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast». *Annual Review of Genetics*, vol. 29, p. 209-230.
- Sanità di Toppi, L., et R. Gabbriellini. 1999. «Response to cadmium in higher plants». *Environmental and Experimental Botany* vol. 41, no 2, p. 105-130.
- Schreiber, U. 2004. «Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorimetry and saturation pulse methos: an overview». In *Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis*, G. C. Papageorgiou et Govindjee, p. 279-319. Dordrecht: Springer.
- Sheng, P. X., Y. P. Ting, J. P. Chen et L. Hong. 2004. «Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 275, no 1, p. 131-141. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158390>>.
- Sivakumar, G., J. Xu, R. W. Thompson, Y. Yang, P. Randol-Smith et P. J. Weathers. 2012. «Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel». *Bioresource Technology*, vol. 107, p. 1-9. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230775>>.
- Speiser, D. M., S. L. Abrahamson, G. Banuelos et D. W. Ow. 1992. «*Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex». *Plant Physiology*, vol. 99, no 3, p. 817-821.
- Spijkerman, E., D. Barua, A. Gerloff-Elias, J. Kern, U. Gaedke et S. A. Heckathorn. 2007. «Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium». *Extremophiles*, vol. 11, no 4, p. 551-562. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429574>>.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran et A. Isambert. 2006. «Commercial applications of microalgae». *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 101, no 2, p. 87-96. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569602>>.

- Stirbet, A., et Govindjee. 2011. «On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 104, no 1-2, p. 236-257. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295993>>.
- Stoiber, T. L., M. M. Shafer et D. E. Armstrong. 2010. «Differential effects of copper and cadmium exposure on toxicity endpoints and gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 29, no 1, p. 191-200. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20821435>>.
- Strasser, B. J. , et R. J. Strasser. 1995. «Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test». In *Photosynthesis: from light to biosphere*, P. Mathis, p. 977– 980. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. «Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria». *Photochemistry and Photobiology* vol. 61, no 1, p. 32-42.
- Strasser, R. J., et A. D. Stirbet. 2001. «Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P. Fitting of experimental data to three different PS II models». *Mathematics and Computers in Simulation*, vol. 56, no 4-5, p. 451–462.
- Strasser, R. J., M. Tsimilli-Michael et A. Srivastava. 2004. «Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient». In *Chlorophyll Fluorescence: a signature of photosynthesis*, G. C. Papageorgiou et Govindjee, p. 321-362. Dordrecht: Springer.
- Tredici, M. R. . 1999. «Bioreactors, photo». In *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, M. C. D. Flickinger. New York: Wiley.
- Tredici, M. R., et G. C. Zittelli. 1998. «Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors». *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, vol. 57, no 2, p. 187-197.
- Ugwu, C. U., H. Aoyagi et H. Uchiyama. 2008. «Photobioreactors for mass cultivation of algae». *Bioresour Technol*, vol. 99, no 10, p. 4021-4028. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379512>>.

- Vega, J. M., I. Garbayo, M. J. Domínguez et J. Vígara. 2006. «Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*, induction of oxidative stress». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no 1, p. 163-167.
- Visviki, I., et J.W. Rachlin. 1994. «Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on ultrastructure». *Archives of environmental contamination and toxicology*, vol. 26, no 2, p. 154-162
- Vredenberg, W. J. 2000. «A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination». *Biophysical Journal*, vol. 79, no 1, p. 26-38.
- Wang, W., B. Vinocur, O. Shoseyov et A. Altman. 2004. «Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response». *TRENDS in Plant Science*, vol. 9, no 5, p. 244-252. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130550>>.
- Wang, X. D., X. J. Liu, S. Yang, A. L. Li et Y. L. Yang. 2007. «Removal and toxicological response of Triazophos by *Chlamydomonas reinhardtii*». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 78, no 1, p. 67-71. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372659>>.
- Whitmarsh, J., et Govindjee. 1999. «The photosynthetic process». In *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*, G. S. Singhal, G. Renger, S. K. Sopory, K. D. Irrgang et Govindjee, p. 11-51: Narosa Publishers.
- World Health Organization (2011). Cadmium in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, WHO/SDE/WSH/03.04/80/Rev/1: 8 p
- Xu, L., P. J. Weathers, X-R. Xiong et C-Z. Liu. 2009. «Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities». *Engineering in Life Sciences*, vol. 9, no 3, p. 178-189.
- Zhang, S., C. B. Qiu, Y. Zhou, Z. P. Jin et H. Yang. 2011. «Bioaccumulation and degradation of pesticide fluroxypyr are associated with toxic tolerance in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*». *Ecotoxicology*, vol. 20, no 2, p. 337-347. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153053>>.